

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
TEHNOLOOGIA INSTITUUT

Kadi-Liis Veiman

**Rakku sisenev peptiid, PepFect14, efektiivseks geeni transpordiks *in vitro* ja *in vivo*  
tingimustes**  
Magistritöö

Juhendajad PhD Taavi Lehto,  
Prof. Ülo Langel

TARTU 2013

# SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Geeniekspressiooni regulatsioon nukleiinhapete vahendusel	7
1.1.1. Geeniteraapia	8
1.1.2. Geenide vaigistamine	9
1.1.3. Geeni funktsiooni taastamine	9
1.2. Bioloogilised barjäärid mitteviraalsel geeni transpordil	10
1.2.1. Ekstratsellulaarsed barjäärid	10
1.2.2. Intratsellulaarsed barjäärid	12
1.3. Geneetilise materjali transport	14
1.3.1. Viraalsed vektorid	14
1.3.2. Mitteviraalsed vektorid	15
1.4. Rakku sisenevad peptiidid	17
1.4.1. Rakku sisenemise mehhanism	17
1.4.2. Endosomaalne kinnijäämine ning vabanemine	18
1.4.3. Transportaan ja tema analoogid	18
1.4.4. PepFect14 pDNA transpordiks	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjalid ja meetodika	22
2.2.1. Peptiidi süntees	22
2.2.2. Nanopartiklite moodustamine ja analüüs	22
2.2.3. Nanopartiklite disintegratsiooni analüüs	23
2.2.4. Nanopartiklite pinnalaengu ja hüdrodünaamilise diameetri mõõtmine	23
2.2.5. Kasutatud rakuliinid	24
2.2.6. Plasmidi <i>in vitro</i> transport	25
2.2.7. SCARA retseptorite inhibitsioon	25
2.2.8. Spektrofluoromeetriline analüüs	26
2.2.9. Läbivoolutsütomeetria	27
2.2.10. Rakkude elulemuse määramine	27
2.2.11. Nanopartiklite transport <i>in vivo</i>	28
2.3. Tulemused	29
	2

2.3.1. Nanopartiklite iseloomustamine	29
2.3.2. Nanopartiklite bioloogiline aktiivsus	31
2.3.3. Nanopartiklite rakkudesse sisenemise mehhanism	33
2.3.4. Nanopartiklite vahendatud geeniekspressioon erinevates rakuliinides.	35
2.3.5. Nanopartiklite geeniekspressioon raskesti transfekteeeritavates rakuliinides.	36
2.3.6. Nanopartiklite vahendatud geeniekspressiooni kirjeldamine	37
2.3.7. Pegüleeritud nanopartiklite iseloomustamine	39
2.3.8. Geenitransport pegüleeritud nanopartiklitega	40
2.4. Arutelu	42
KOKKUVÕTE	45
SUMMARY	46
TÄNUSÕNAD	47
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	48
LISAD	52
LISA 1	52
LISA 2	53
LIHTLITSENTS	65

## KASUTATUD LÜHENDID

AH	Aminohape
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i> , hiina hamstri munasarja rakud
CQ	<i>Chloroquine</i> ; klorokviin, endosomolüütiline reagent
CR	<i>Charge ratio</i> , laengu suhe.
CS	<i>Chondroitin sulfate</i> , kondroitiinsulfaat
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> , footonkorrelatsiooni spektroskoopia
DS	<i>Dextrane sulfate</i> , dekstraansulfaat
ECM	<i>Extracllular matrix</i> , ekstratsellulaarne maatriks
EMA	Euroopa meditsiini agentuur
EtBr	Etiidiumbromiid
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> , fluorestsentsi poolt aktiveeritav rakkude sorteerija
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , veise looteseerum
Fuc	<i>Fucoidan</i> , fukoidaan
Gal	<i>Galactose</i> , galaktoos
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells</i> , inimese embrüonaalsed neerurakud
I.v	Intravenoosne manustamine
LF2000	<i>Lipofectamine</i> <sup>TM</sup> 2000
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i> , hiire embrüonaalsed fibroplastid
mES	<i>Mouse embryonic stem cells</i> , hiire embrüonaalsed tüvirakud
MPS	<i>Mononuclear phagocytic system</i> , mononukleaarsete fagotsüütide süsteem
MQ	Deionoseeritud vesi
NH	Nukleinhape
nsPF14	<i>Not stearylated PepFect14</i> , stearüülrühmata PepFect14
ON	Oligonukleotiid
pAntp	Penetratiin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , fosfaat-puhverdatud soola lahus
pDNA	Plasmiidne DNA
pEGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> , võimendatud roheliselt fluorestseeruvat valku kodeeriv plasmiidne DNA
PEI	Polüetüleenimiin
PF	PepFect-id, transportaan10-l põhinevad modifitseeritud rakku sisenevad peptiidid



PF14	PepFect14
PF3	PepFect3
PF6	PepFect6
pGL3	Lutsiferaasi kodeeriv plasmiidne DNA
Pol C	<i>Polycytidylic acid</i> , polütsütidüülhape
Pol I	<i>Polyinosinic acid</i> , polüinosiinhape
RD4	Inimese skeletilihase rakuliin
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> , suhteline fluorestsentsi ühik
RLU	<i>Relative light unit</i> , suhteline valguse ühik
RNAi	RNA interferents
RSP	Rakku sisenev peptiid
SCARA	<i>Class A Scavenger receptors</i> , klass A <i>Scavenger</i> retseptorid
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i> , raske kombineeritud immuunpuudulikkus
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
SKO	Splaissingut korrigeerivad oligonukleotiidid
TP	Transportaan
TP10	Transportaan10
U2OS	<i>Human osteosarcoma cells</i> , inimese osteosarkoomi rakud
U87	<i>Human glioblastoma cells</i> , inimese glioblastoomi rakud
UT	<i>Untreated</i> , töötlemata rakud

## SISSEJUHATUS

Viimaste aastakümnete saavutused inimese genoomi täielikus sekveneerimises ja personaalmeditsiini väljatöötamisel on võimaldanud identifitseerida rohkesti seoseid mutatsioonide ning nende poolt põhjustatud vigase geeniekspressiooni vahel. See on viinud mitmete meetodite väljatöötamisele, mis võimaldavad reguleerida geeniekspressiooni molekulaarsel tasemel. Üheks strateegiaks on nukleiinhapetel (NH) ning nende analoogidel põhinevad tehnoloogiad, mis võimaldavad efektiivselt reguleerida vigaseid geeniekspressiooni tasemeid rakkudes.

Geneetilise materjali toimetamine sihtpunkti eeldab mitmete rakusiseste ja rakuväliste barjääride ületamist. Ainult väga madala molekulmassiga ning neutraalsed osakesed suudavad rakumembraani läbida passiivse difusiooni teel, suuremad makromolekulid peavad kasutama selleks aktiivset transporti. Rakkudesse viidav funktsionaalne geen sisestatakse tavaliselt bakteriaalse päritoluga pasmiidi (pDNA), kuid füsiokokeemiliste omaduste tõttu on tema rakku sisenemine piiratud ning bioloogilise aktiivsuse saavutamiseks on vajalik kasutada transportvektoreid.

Nukleiinhapete transportimisel kasutatavad vektorid on võimalik jagada vastavalt nende päritolule kaheks – viraalsed ning mitteviraalsed vektorid. Viraalsete vektorite põhiliseks eeliseks on väga efektiivne geneetilise materjali viimine rakkudesse, kuid patogeense päritolu tõttu on nende kasutamine alati seotud potentsiaalsete kõrvaltoimetega, lisaks pole nad sobivad lühikeste sünteetiliste oligonukleotiidide (ON) transpordiks. See on viinud mitteviraalsete vektorite väljatöötamisele, mis on tavaliselt sünteetilised, katioonse iseloomuga materjalid, mille põhiliseks omaduseks on kondenseerida pDNA-d nanosuurusteks partikliteks. On näidatud, et mitteviraalsed vektorid on enamasti ohutumad, kuid mitte nii efektiivsed kui viraalsed vektorid.

Üks võimalikke lahendusi sellele kesksele probleemile võib olla 5-40 aminohapet (AH) pikad peptiidsed ühendid, rakku sisenevad peptiidid (RSP), mis suudavad nii rakukultuuris kui ka loomsetes mudelites rakkudesse toimetada väga erinevaid bioloogilisi ühendeid, seal hulgas nukleiinhappeid. Antud töö eesmärk on uurida, kas splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide (SKO) transpordi jaoks välja töötatud RSP, PepFect14 (PF14) on võimalik kasutada pDNA transpordiks, seejärel iseloomustada nende komplekside füsiokokeemilisi omadusi ning vektori vahendatud geeniekspressiooni erinevates rakuliinides, samuti välja selgitada rakku sisenemise mehhanismid ning saada esmakordselt aimu PF14-vahendatud NH-de transpordist *in vivo*. Töös esitatud katsed viidi läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

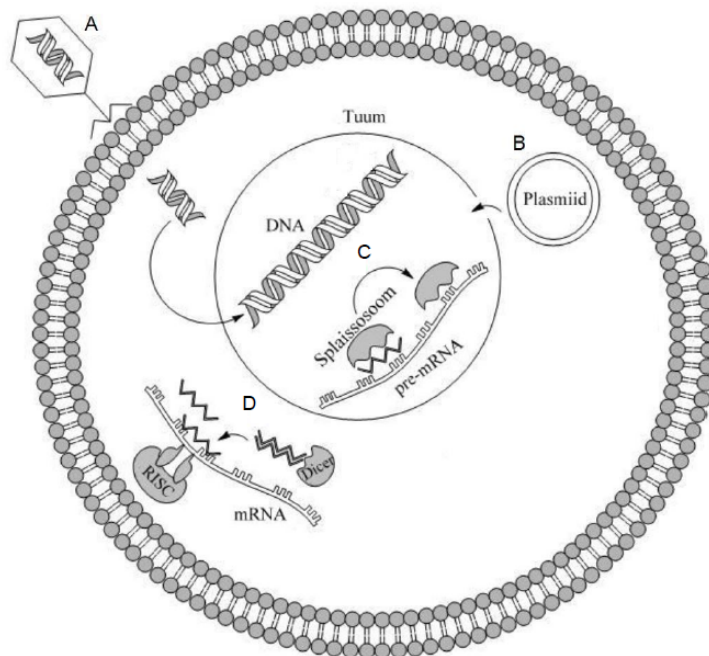
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Geeniekspressiooni regulatsioon nukleiinhapete vahendusel

Nukleiinhapetel ning nende analoogidel on suur potentsiaali ravida mitmeid haigusi, mis on põhjustatud vigasest geeniekspressioonist või selle puudumisest, näiteks tsüstiline fibroos, Parkinsoni tõbi ning erinevad vähi vormid (Griesenbach jt., 2004; Burton jt., 2003; Kerr, 2003). Geneetiline materjal toimetatakse defekte kandvatesse rakkudesse või kudedesse, kus ta võimaldab taastada või vaigistada vigaste geenide ekspressiooni tasemeid (Glover jt., 2005).

Vastavalt nukleiinhapete terapeutilisele efektile võib geneetilise materjali regulatsiooni jagada kolmeks (Lehto jt., 2011 a; joonis 1):

- vigase geeni asendamine funktsionaalsega, kasutades geneetilise materjali transpordiks viraalseid või mitteviraalseid vektoreid;
- defekte põhjustavate geenide post-transkriptsiooniline vaigistamine RNA interferents (RNAi) tehnoloogiat kasutades;
- geeni funktsiooni modifikatsioon SKO-de vahendusel, mis võimaldab mõjutada pre-mRNA splaissingut;



**Joonis 1.** Erinevad võimalused geeniekspressiooni regulatsiooniks: A – nukleiinhapete transport rakku, kasutades rekombinantseid viiruseid; B – plasmidi toimetamine rakutuumas; C – geeni ekspressiooni regulatsioon splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide vahendusel; D – geenide vaigistamine RNAi-l põhinevat tehnoloogiat kasutades (Lehto jt., 2011 a).

### 1.1.1. Geeniteraapia

Euroopa Meditsiiniagentuur (EMA) defineerib geeniteraapiaks kasutatavad nukleiinhappe molekulid kui bioloogilised ravimid, mis vastavad järgmistele kriteeriumitele:

- a) nad sisaldavad ravitoimeks rekombinantseid nukleiinhappeid, mis manustatakse inimorganismi eesmärgiga reguleerida, parandada, asendada, lisada või kustutada geneetilisi järjestusi;
- b) nende raviv, ennetav või diagnostiline efekt on seotud otseselt rekombinantsete nukleiinhapete järjestusega või nende poolt ekspresseeritud produktiga (Wirth ja Ylä-Herttuala, 2013).

Mitmed geneetilised häired ja erinevad vähitüübid on põhjustatud defektidest geenides, mille tagajärjel võib selle kadunud funktsionaalsus viia tõsiste komplikatsioonide välja kujunemiseni. Funktsionaalse geeni transport rakkudesse võimaldab taastada füsioloogilisi geeniekspressiooni tasemeid ning leevendada või ravida defektset fenotüüpi. Geeniteraapia võimaldaks ravida mitmeid haigusi, millel senini puudub efektiivne ravi, näiteks tsüstiline fibroos, kombineeritud immuunpuudulikkuse sündroom, hemofiilia ning vähk.

Mitmete pärilike haiguste raviks on vajalik pikaajaline ning stabiilne geeniekspressioon, samas on näiteks vähi teraapia puhul vajalikud lühiajalised kuid kõrged geenide avaldumise tasemed. Kaasnevalt ja sõltumata geeniteraapia rakendustest, peaks geeniekspressioon olema kontrollitav ning selle saavutamine peab olema ohutu patsiendi jaoks (Pack jt., 2005). Põhjus, miks geeniteraapia meditsiinis veel laialdast kasutust pole senini leidnud, peitub enamasti kõikidele nõudmistele vastava geeni transportvektori leidmises.

Senini on geeniteraapia kliinilistes katsetustes ülekaalukalt esindatud viraalsed vektorid (joonis 4.). Vastavalt sihtmärkrakkude olemusele on võimalik valida erinevate viraalsete vektorite vahel, prolifereeruvaid rakke nakatavad vektorid sobivad hästi geneetilise materjali transpordiks aktiivselt jagunevatesse tüvirakkudesse, lõplikult diferentseerunud somaatilisi keharakke on võimalik transdukteerida viirustega, mis nakatavad mittejagunevaid rakke (Cavazzana-Calvo ja Fischer, 2007). Kord sihtmärkrakku jõudes peab geneetiline materjal olema piisavalt stabiilne, ei tohiks integreeruda mitte-spetsiifiliselt genoomi ning manustatav geenidoos peaks olema kontrollitav (Wirth ja Ylä-Herttuala, 2013). Viraalsed vektorid ei täida alati kõiki neid nõudeid ning seetõttu on suurenenud huvi mitteviraalsete transportsüsteemide vastu. Sellistel vektoritel puudub enamasti kõrge efektiivsus, kuid nende suureks eeliseks geeniteraapilistes rakendustes on geeniekspressiooni kontrollitavus ning sobivus organismile.

### 1.1.2. Geenide vaigistamine

Lisaks funktsionaalse geeni transpordile on üks paljutöötavamaid NH-del põhinevaid rakendusi geeniekspressiooni regulatsiooniks geneetilistele järjestustele komplementaarsete ON-ide kasutamine (ehk antisens tehnoloogiad), mis võimaldab reguleerida nende ekspressiooni tasemeid väga kõrge spetsiifilisusega. Levinuimaks võimaluseks on kasutada eukarüootsetes rakkudes esinevat post-transkriptsioonilist geenide vaigistamisrada ehk RNA interferentsi. RNAi avastati 1998. aastal organismis *C. Elegans*, kus näidati, et kaheaahelised RNA-d on võimelised vaigistama geeniekspressiooni (Fire jt., 1998). 2001. aastal näitas Tuschl jt., et sünteetilised 21-23 bp pikad siRNA (*small interfering RNA*) dupleksid on võimelised vaigistama imetaja rakkude geene (Elbashir jt., 2001). Praeguseks on sünteetilisi siRNA-sid ja RNAi-d väga laialdaselt kasutatud näiteks vähigeenide vaigistamiseks *in vivo* (Halder jt., 2006; Takeshita jt., 2005).

RNAi on eukarüootsetes rakkudes evolutsiooniliselt konserveerunud post-transkriptsiooniline geenide vaigistamisrada, mille käigus ensüüm Dicer lõikab pikad kaheaahelised RNA molekulid lühemateks fragmentideks ehk siRNA-deks ning viimased vahendavad komplementaarsete mRNA-de lõikamist läbi RISC (*RNA-induced silencing complex*) kompleksi ning selles asuva argonaute 2 valgu (joonis 1 G), mis keerab siRNA lahti ja tema üks ahelatest lagundatakse ning teine ahel seotakse RISC kompleksi, mis aktiveerub ning vastavalt seotud ahela komplementaarsusele lagundab mRNA (Whitehead jt., 2009). RNAi rakendamine geeniteraapias sünteetiliste siRNA-de vahendusel võimaldab vaigistada peaaegu kõiki teadaolevate järjestustega geene, olles nii väga suure potentsiaaliga strateegia paljude erinevate haiguste raviks.

### 1.1.3. Geeni funktsiooni taastamine

Veel üheks võimaluseks muuta post-transkriptsioonilisi geeniekspressiooni tasemeid on kasutada splaissingut mõjutavaid SKO-sid, mis on lühikesed *antisense* oligonukleotiidid. Alternatiivne splaissing on post-transkriptsiooniline mehhanism, mis leiab aset raku tuumas valk-kompleksi vahendusel nimega splaissosoom. Ebaküps pre-mRNA transkript splaissitakse samal viisil ning eksonid ühendatakse kokku nagu nad esinevad ka transkriptis. Alternatiivne splaissing võimaldab sama geeni pealt toota erinevaid mRNA transkripte, kasutades selleks erinevaid splaissingu mustreid. Splaissinguks on vaja introni 5' otsas asuvat doonorsaiti, hargnemiskohta, mis asub introni 3' otsa lähedal ning introni 3' otsas olevat akseptorsaiti, splaissosoom katalüüsib korrektset lõikamist ning eksonite ühendamist (Matlin jt., 2005; Black, 2003)

Erinevad mutatsioonid võivad mõjutada normaalseid splaissingu mustreid, mis võib viia tõsiste haiguste välja kujunemiseni, seal hulgas Duchenne'i lihasdüstroofia ja erinevad vähi vormid. SKO-sid on võimalik kasutada pre-mRNA splaissingu regulatsiooniks, mis võimaldab õige splaissingu taastamist, uue splaiss-variandi produktsiooni või ühe splaiss-variandi muutmist teiseks.

## ***1.2. Bioloogilised barjäärid mitteviraalsel geeni transpordil***

Mitteviraalne geneetilise materjali transport valitud rakkudesse organismis hõlmab mitmete erinevate bioloogiliste barjääride ületamist, mida võib jagada vastavalt nende paiknemisele organismis ekstratsellulaarseteks ning intratsellulaarseteks. Enim levinud terapeutiliste molekulide manustamisviis on intravenoosne (*i.v.*) manustamine, sest nii on terapeutiliste molekulide biosaadavus kõrge ning läbi vereringe on nendel hea ligipääs enamikesse kudedesse. Peamisteks takistusteks pDNA transpordil vereringest raku tuuma on (Nakase jt., 2010):

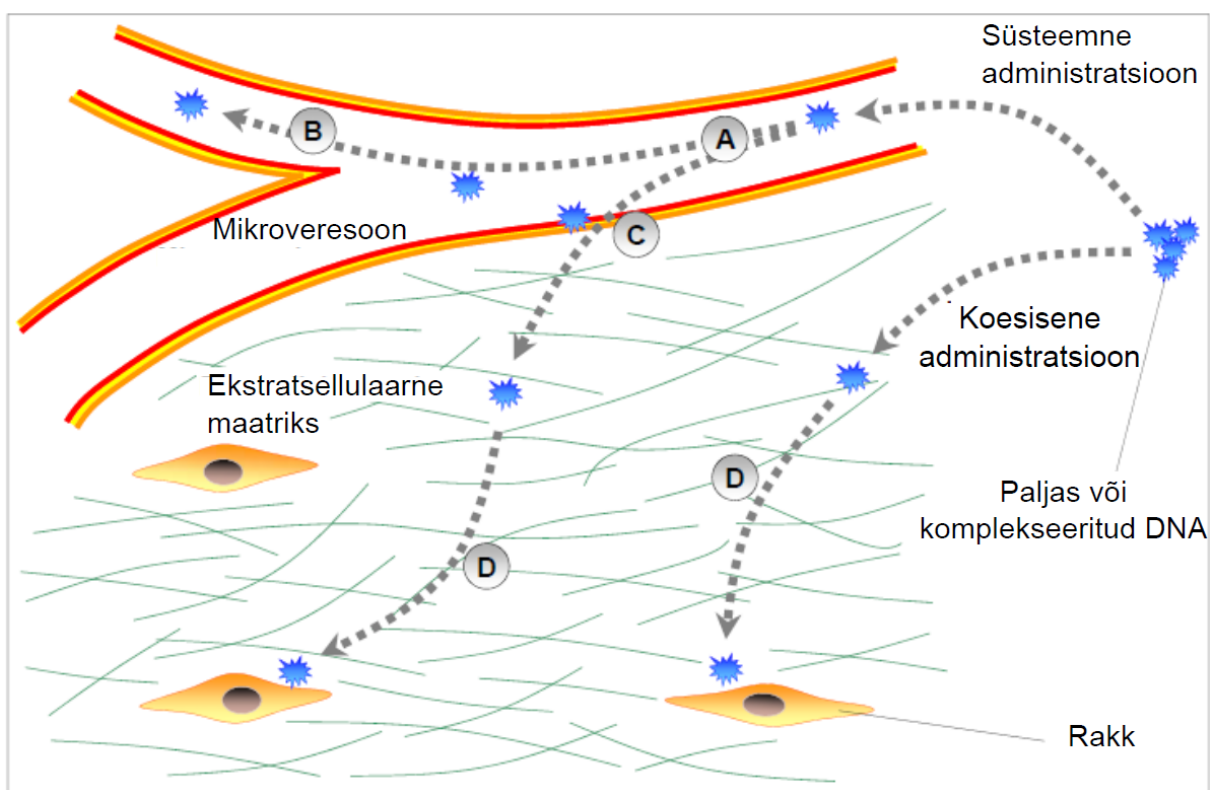
- vaba pDNA stabiilsus vereringes;
- organitesse või rakkudesse jõudmise efektiivsus;
- rakkude plasmamembraani läbimine;
- endosoomidest vabanemine raku tsütosooli;
- pDNA akumulatsioon tuuma.

### **1.2.1. Ekstratsellulaarsed barjäärid**

pDNA *i.v.* manustamisel on esmalt mitu rakuvälist barjääri mis on sihtmärk rakkudesse pääsemiseks vaja ületada. Vaba pDNA on väga vastuvõtlik veres leiduvatele lagundavatele nukleasidele (joonis 2A), tema poolväärtusaeg on lühike, kontsentratsioonil 100 µg/ml on see kõigest 10 minutit (Kawabata jt., 1995). Modifitseerimata pDNA sisaldab bakteriaalseid elemente, näiteks metüleerimata CpG järjestusi, mis meelitab hõlpsasti ligi immuunsüsteemi komponente (Sato jt. 1996). pDNA komplekseerimine transportvektoriga võimaldab kaitsta teda ensümaatilise lagundamise eest (joonis 2B), hoides pDNA tervena bioloogilise aktiivsuse saavutamiseks ning aitab hoiduda mononukleaarsete fagotsüütide süsteemi (MPS) poolt läbiviidavast kiirest eliminatsioonist (Viola jt., 2010). Nii vaba kui ka komplekseeritud pDNA eliminatsiooni vereringest viivad läbi maksas ja põrnas asuvad MPS makrofaagid, mis elimineerivad seerumivalkudega seondunud ehk opsoniseeritud DNA (Li ja Huang, 2009). On näidatud, et eelistatult opsoniseeritakse vereringes laetud partikleid, neutraalselt laetud

partiklid on oluliselt vähem opsoniseeritud (Roser jt., 1998). DNA/vektor kompleksi poolväärtusaja pikendamiseks vereringes on kõige levinuimaks strateegiaks polüetüleenglükool (PEG) molekuli kovalentne konjugeerimine transportvektorile (Gref jt., 2000; Essa jt., 2010). PEG molekul varjab partiklite pinnalaengud, samuti blokeerib ta nanopartiklite adhesiooni veres esinevate valkudega, pikendades partiklite poolväärtusaega vereringes ning suurendades seeläbi pDNA potentsiaalset biosaadavust rakkudes (Owens ja Peppas, 2006).

Selleks, et jõuda rakkudeni, peab pDNA esmalt veresoontest ekstravaseeruma (joonis 2C), sattudes seejärel rakke ümbritseva ekstratsellulaarse maatriksini (ECM; joonis 2D), milles lisaks nukleaasidele paiknevad ekstratsellulaarse maatriksi kiud, mis piiravad pDNA-ga laetud osakeste liikumist läbi maatriksi (Wang jt., 2013).



**Joonis 2.** *In vivo* DNA süsteemsel manustamisel esinevad rakuvälised barjäärid. A – DNA lagundatakse vereringes esinevate nukleaaside poolt; B – DNA eemaldatakse MPS-i poolt; C – DNA ekstravasatsioon vereringest ECM-i jõudmiseks; D – ECM-i läbimine rakkudeni jõudmiseks (Wang jt., 2013).

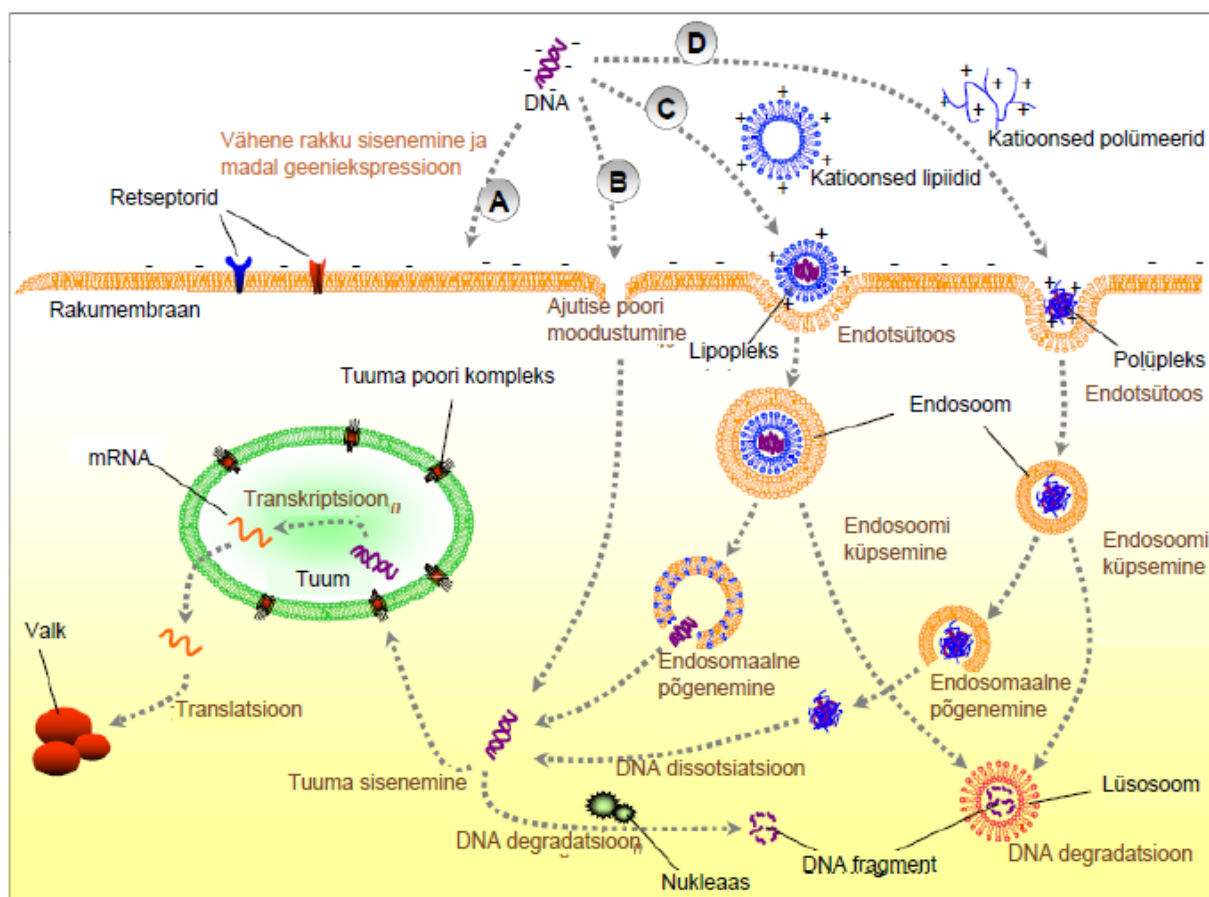
### 1.2.2. Intratsellulaarsed barjäärid

Selleks, et geneetiline materjal jõuaks ECM-ist oma toimekohani raku sees, peab ta esmalt läbima plasmamembraani. pDNA füsikokeemilised omadused nagu suur molekulmass ning negatiivne laengutihedus piiravad passiivset difusiooni läbi plasmamembraani (joonis 3A) (Wang jt., 2013). Selleks, et pDNA-d rakkudesse viia, on välja töötatud füüsikalised ja keemilised meetodid. Füüsikalised meetodid, näiteks geenipüss või elektroporatsioon tekitavad rakumembraanidesse ajutised poorid, mille kaudu pDNA-l on võimalik rakku siseneda (joonis 3B). Keemilised meetodid põhinevad enamasti transportvektoritel, mis on enamasti katioonsed polümeerid, lipiidid või peptiidsed ühendid, mille vahendusel pääseb komplekseeritud pDNA rakku enamasti endotsütoosi teel (joonis 3C ja D; Wang jt., 2013).

Endotsütoos-vahendatud DNA sisenemist rakkudesse piirab endotsütootilistesse vesiikulitesse kinnijäämine, varajased vesiikulid küpsevad, kuni muutuvad lüsoosoomideks, mille hüdrofüüsilised ensüümid lagundavad väga suure osa rakkudesse sisenenud pDNA-st (Wattiaux jt., 2000). Geneetilise materjali vabanemiseks endosoomidest on mitu strateegiat, millest enamus indutseerivad endosomolüüsi ning võimaldavad pDNA-l jõuda tsütoplasmasse (joonis 3) (Medina-Kauwe jt., 2005). Vaba pDNA sattumisel tsütoplasmasse toimub jällegi selle kohene lagundamine, kuid komplekseerimine transportvektoriga võimaldab ära hoida pDNA kiiret lagundamist (Moret jt., 2001).

Plasmiidi sisestatud geneetilise informatsiooni transpordil geeniteraapia rakendamiseks on vajalik, et ta satuks tuuma, kus saab toimuda geneetilise informatsiooni avaldumine. Tuum on kahekihilise membraaniga ümbritsetud organell, kuhu biomolekulide transport on rangelt reguleeritud. Tuuma lokaliseeruvad valgud kannavad enamasti tuuma lokaliseerumissignaali ning see võimaldab neil tuumamembraani läbida, kasutades tuuma pooride kompleksi (Wente, 2000). DNA akumulereub enamasti perinukleaarsesse regiooni, kust ainult väike osa lokaliseerub tuuma. (joonis 3; Bieber jt., 2002)





**Joonis 3.** Mitteviraalsel geenitranspordil esinevad rakusisesed barjäärid. A – vaba DNA ei suuda läbida rakumembraani, B – füüsikalised meetodid võimaldavad DNA sisenemist raku, tekitades plasmamembraani ajutised poorid. Keemilised mitteviraalsed meetodid, nagu näiteks liposoomid – C ja katioonsed polümeerid/peptiidid – D, kondenseerivad DNA osakesteks, mis on võimelised raku sisenema endotsütoosi teel. Pärast rakumembraani läbimist peab DNA vabanema endosoomidest, vältimaks lagundamist rakusiseste nukleaside poolt ning geeni transpordi puhul peab suutma läbida ka tuuma membraani. (Wang W, jt., 2013).

### ***1.3. Geneetilise materjali transport***

Nukleiinhappe molekulide spontaanne rakku sisenemine on piiratud nende kõrge negatiivse kogulaengu ja suure molekulmassi tõttu ning seepärast on geeniteraapia kasutusala tugevasti pärsitud vaba pDNA ebaefektiivse sisenemise tõttu rakkudesse (Liu jt., 2007). Seetõttu vajavadki sellised molekulid transportvektorite kasutamist ning vektorite üldised omadused peaksid olema järgmised:

- geneetiline materjal peab olema vektoriga seotuna stabiilne;
- ta peab suutma vastu pidada ensümaatilisele lagundamisele;
- transportvektor peab efektiivselt rakku sisenema;
- endotsütoosi teel rakku sisenedes peab lastmolekul (seotuna transportvektoriga) olema võimeline vabanema endotsütootilistest vesiikulitest tsütoplasmasse;
- kord sihtmärgini jõudes, peab pDNA vähemalt osaliselt eralduma vektorist;
- geeniekspressioon peab olema stabiilne ja kontrollitav;
- transportvektor ja transporditav materjal ei tohi olla rakkudele toksiline.

Vektorid jagunevad vastavalt päritolule kaheks – viraalsed ja mitteviraalsed vektorid.

#### **1.3.1. Viraalsed vektorid**

Enim kasutatud vektorid geeniteraapiaks on viraalsed vektorid, kuna nad on väga efektiivsed geneetilise materjali rakkudesse toimetamises ning geeniekspressiooni indutseerimises. Viraalsete vektorite eelisteks on nende kõrge transduktsiooni efektiivsus rakkudes ning pikaajalise ja stabiilse geeniekspressiooni tekitamine. Nende kasutus geeniteraapia rakendustes on piiratud immunogeensuse ja insertioonilise mutageneesiga; rakku viidava geneetilise materjali maht ei saa ületada nende enda genoomi suurust. Siiski moodustavad suure osa geeniteraapia kliinilistes katsetustes kasutatud vektoritest rekombinantsetest viirustest saadud vektorid (joonis 4), kus viirustest on replikatiivsed elemendid eemaldatud.

Gammaretroviraalsed vektorid on leidnud kõige laialdasemat kasutatust kliinilistes katsetustes. Nad põhinevad RNA viirustel, mis on võimelised nakatama prolifereruivaid rakke (Giacca ja Zacchigna, 2012). Seevastu adenoviirused on kaheahelalise DNA genoomiga viirused, mis suudavad nakatada nii jagunevaid kui ka mittejagunevaid rakke, kuigi adenoviraalsed vektorid on väga efektiivsed transgeeni viimisel erinevatesse rakkudesse, siis nende suurimaks tagasilöögiks on rakkudele tugev toksilisus viraalsete valkude suhtes, seepärast on välja töötatud mitmeid strateegiaid vähendamaks nende toksilisust (Giacca ja Zacchigna, 2012).

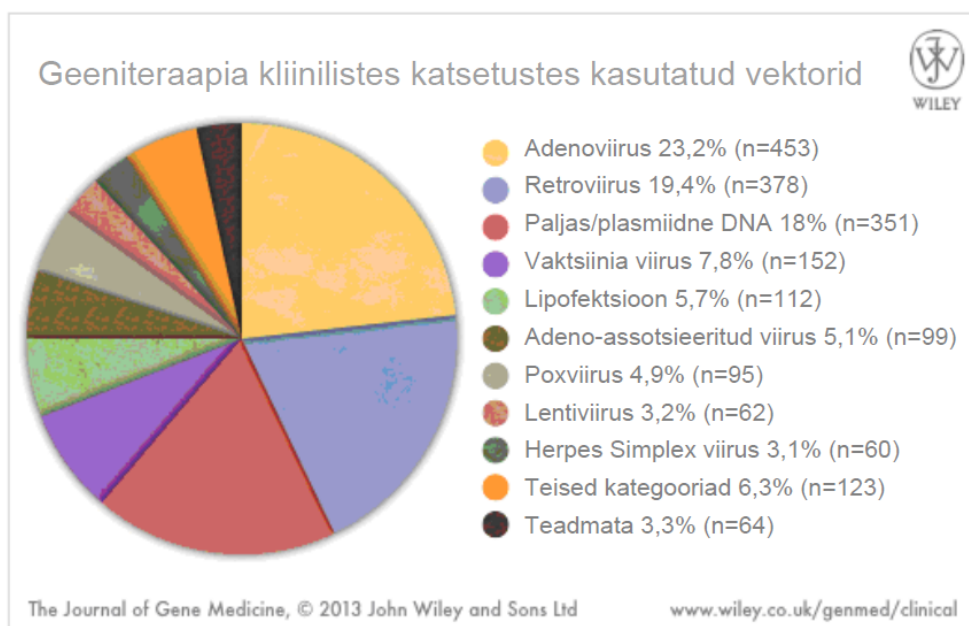
Üleüldiselt on viraalsetel vektoritel suur potentsiaal transgeeni efektiivsel rakku toimetamisel ning selle stabiilisel ekspressioonil. Traditsioonilisi vektoreid on kasutatud mitmetes kliinilistes katsetustes erinevate haiguste raviks, kuid hoolimata efektiivsusest on nende kasutus seotud mitmete probleemidega, eriti ohutusega. Siiski on geeniteraapia kliinilistes katsetustes valdavalt suur hulk viraalseid vektoreid, ~67% (joonis 4) ning 2012. aastal andis ka EMA nõusoleku esimeseks viraalseks geeniteraapia produkti kasutuseks Euroopa Liidus (Wirth ja Ylä-Herttua, 2013). Hoolimata viraalsete vektorite edust, on viimasel kümnendil suur osa uurimustööst suunatud efektiivsete ja ohutute mitteviraalsete geeni transportvektorite leidmisele.

### 1.3.2. Mitteviraalsed vektorid

Mitteviraalsed geeni transportvektorid põhinevad sünteetistel keemilistel molekulidel või füüsikalistel meetoditel. Kuigi füüsikalised meetodid, näiteks mikroinjektsioon või elektroporatsioon on *in vitro* tingimustes väga efektiivsed, puudub neil enamasti kliiniline perspektiiv. Enamus keemilisi sünteetilisi mitteviraalseid vektoreid on polükatioonsed molekulid, mis suudavad pDNA-d kondenseerida nanosuurusteks partikliteks, neutraliseerides tema negatiivse kogulaengu ning vahendades geneetilise materjali transfektsiooni rakkudes. Mitteviraalsete vektorite eelisteks on enamasti nende ohutus, nende poolt rakku viidava geneetilise materjali suurus pole piiratud ning nende suhteliselt lihtsam ja odavam tootmisviis. Suurimaks piiranguks võrreldes viraalsete vektoritega on ebaefektiivne transgeeni toimetamine rakkudes ning probleemid stabiilsete ning reprodutseeritavate formulatsioonide moodustamisel, eriti *in vivo* tingimustes.

Lipofektsioon ehk liposoomide kasutamine rakkude transfekteerimisel on senini enim levinud mitteviraalne transfektsioonimeetod, mis on jõudnud ka geeniteraapia kliinilistesse katsetustesse (Joonis 4). Liposoomid on uni- või multilamellaarsed sfäärilised vesiikulid, mis peamiselt koosnevad fosfolipiididest (Sen ja Mandal, 2013). Lipiidne kaksikkiht pakub kaitset liposoomi sisemuses asuvatele hüdrofiilsetele terapeutilistele molekulidele, hüdrofoobsed terapeutilised molekulid asuvad lipiidses kaksikkihis, olles samuti kaitstud organismi ensüümide eest (Portney ja Ozkan, 2006). Lipiidsete vesiikulite valmistamine on lihtne ning vähekulukas, samuti on liposoomi lihtne modifitseerida erinevate keemiliste ühenditega. Üheks selliseks on polüetüleenglükooli (PEG) molekulide lisamine, et pikendada liposoomide poolväärtusaega vereringes ning vältida interaktsioone mononukleaarsete fagotsüütidega (Blume ja Cevc, 1990). Suurimaks tagasilöögiks liposoomide kasutamisel transfektsioonivektoritena on nende toksilisus (Lappalainen jt., 1994).

Katioonsete polümeeride potentsiaali geneetilise materjali transfekteerimiseks rakkudesse on palju uuritud. Positiivse laengujaotuse tõttu kondenseerivad nad pDNA nanosuurusteks partikliteks, võimaldades nii NH efektiivsemat rakkudesse sisenemist, kasutades selleks enamasti endotsütoosi. Nagu suurel osal mitteviraalsetel vektoritel, on ka katioonsete polümeeride suurimaks tagasilöögiks endosoomidest vabanemine. Sellest ülesaamiseks on kasutatud mitmeid keemilisi strateegiaid, mis enamasti põhinevad endosomaalsete vesiikulite destabilisatsioonil (Midoux P., jt., 2009). Näiteks katioonse polümeeri, polüetüleenimiini (PEI) geeni transpordi efektiivsus tuleneb tema suurest puhverdusvõimest ja sellest tulenevast endosomoslüüsi efektiivsusest (Boussif jt., 1995).



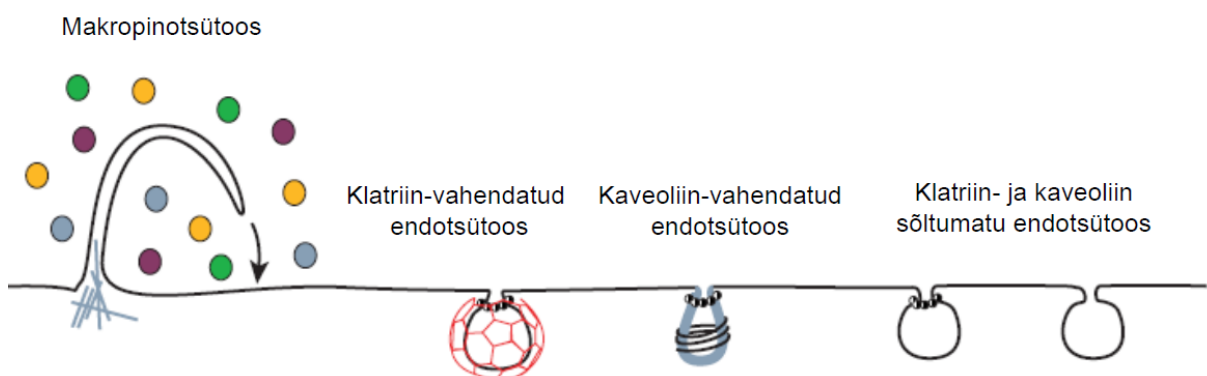
**Joonis 4.** Geeniteraapia kliinilistes katsetustes kasutatud viraalsed ja mitteviraalsed vektorid.

## 1.4. Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (RSP) on katioonsed ja/või amfipaatseid, kuni 30 aminohapet pikad peptiidid ühendid, mis on võimelised läbima erinevaid bioloogilisi barjääre ning toimetama endaga seotud bioloogiliselt aktiivseid lastmolekule raku sisemusse. Esimesed märged RSP-dest tehti 1988. aastal, kui kaks gruppi üksteisest sõltumatult avastasid, et Tat valk oli võimeline translokeeruma läbi rakumembraani rakukultuuri tingimustes (Green jt., 1988; Frankel jt., 1988). Mõned aastad hiljem avastati, et 60 aminohappeline homeodomään *Drosophila Antennapedia* valgust oli samuti võimeline läbima rakumembraani (Joliot jt., 1991). Selle avastuse põhjal tehti kindlaks, et translokatsiooni jaoks on vajalik ning piisav homeodomääni kolmas heeliks, 16-aminohappeline peptiid nimega penetratiin (pAntp) (Derossi jt., 1994) ning seda peetakse RSP-de kui teadusharu alguseks. Praeguseks leidub sadu erinevaid RSP-sid ning neid käsitlevate tööde hulk on kasvanud eksponentsiaalselt.

### 1.4.1. Rakku sisenemise mehhanism

RSP-d võivad rakku siseneda kahel moel – endotsütoosi teel ning otseselt läbi rakumembraani translokeerudes. Lastmolekulidega seotuna kasutavad RSP-d rakku sisenemiseks enamasti endotsütootilisi teid, seal hulgas klatriin-vahendatud endotsütoosi, kaveoliin-vahendatud endotsütoosi, makropinotsütoosi ning klatriin – ja kaveoliin-mittevahendatud endotsütoosi (joonis 5) (Stewart jt., 2008). On näidatud, et erinevad peptiidid võivad rakku sisenemiseks kasutada erinevaid endotsütootilisi teid, ning sama peptiid võib samuti kasutada erinevaid sisenemisteid (ka paralleelselt) sõltuvalt temaga seotud lastmolekulidest, tema enda kontsentratsioonist, kasutatavast rakuliinist jne.



**Joonis 5.** Erinevad endotsütootilised rajad. (Conner ja Schmid, 2003)

### **1.4.2. Endosomaalne kinnijäämine ning vabanemine**

Kuna RSP-d seotuna lastmolekulidega kasutavad enamasti rakku sisenemiseks endotsütootilisi teid, siis nende põhiliseks biosaadavust limiteerivaks teguriks rakus on mittepiisav vabanemine endosomaalsetest vesiikulitest, mis viib enamuse RSP ja lastmolekulide lagundamiseni lüsoosoomides. Sellest ülesaamiseks on välja töötatud mitmeid strateegiaid, näiteks on näidatud, et endosomolüütiline liitpeptiid, mis on pärit influenza viiruse ümbrise glükoproteiini, hemoglutiniini teise subühiku (HA2) N-terminaalsest domeenist (mis omakorda vastutab endosomolüüsi eest viiruse infektsioonis), on võimeline seotuna RSP-ga indutseerima tema ja lastmolekuli endosomaalset vabanemist (Liou jt., 2012). Rakukultuuri tingimustes on geeni transportimiseks võimalik kasutada näiteks endosoomide hapustumist ennetavat ning osmootse rõhu tõusust tulenevat endosoomide lagunemist tingivat klorokviini, mis kõrgendab bioloogilist aktiivsust transfekteeeritud rakkudes oluliselt, kuid organismi tasemel ei ole see rakendatav (Erbacher jt., 1996). Varasemalt on näidatud, et modifikatsioonid rasvhapetega suurendavad teatud RSP-de bioaktiivsust mitmeid kordi, millest tuleb juttu allpool.

### **1.4.3. Transportaan ja tema analoogid**

RSP-d võib jagada päritolu alusel kolmeks – looduslikult esinevatest valkudest tuletatud (nt. Tat ja Penetratiin), kimäärsed peptiidid ning sünteetilised peptiidid nagu oligoarginiinid. Kimäärsete peptiidide eredaimaks näiteks on transportaan (TP), mis on 27 AH-line peptiid, mille aminoterminaalses osas paikneb 12 AH-line neuropeptiid galaniin ning karboksüterminaalses 13 AH-line vapsiku toksiin mastoparaan, mis on omavahel ühendatud lüsiiniga (Pooga jt., 1998). Transportaanist sünteesiti mitmeid erinevaid analooge, leidmaks translokatsiooni eest vastutavad järjestused ning nende seast selgitati välja peptiid, mis lisaks efektiivsele sisenemisaktiivsusele oli rakkudele mitte-toksiline. Saadud peptiid oli transportaani analoog 10 (TP10), 21 aminohappeline peptiid, millel puudus 6 N-terminaalset aminohapet võrreldes TP-ga (Soomets jt., 2000).

TP10 on eellaspeptiid PepFect (PF) peptiididele, mis on erinevatele keemilistele lisamodifikatsioonidele põhinevad teise põlvkonna peptiidid ning katioonse iseloomu tõttu on nende peamine kasutusala nukleiinhapete transport rakkudesse. Nukleiinhapped (ON, pDNA, siRNA) kannavad suurt negatiivset laengutihedust ning kasutades katioonse peptiidi ja nukleiinhappe vahelisi elektrostaatilisi jõudusid on võimalik kasutada väga lihtsat mitte-kovalentset strateegiat stabiilsete nanopartiklite moodustamiseks (Lehto jt., 2010). Üks edukamaid RSP-de, seal hulgas TP10 modifikatsioone bioaktiivsuse suurendamiseks on stearüülrühma lisamine, mis võimaldab pDNA kondenseerida väga stabiilseteks

nanopartikliteks ning see tõstab peptiidide bioaktiivsust mitmeid kordi. Lisaks elektrostaatilistele jõududele muudab hüdrofoobne stearüülrühm partikleid veelgi stabiilsemaks ning samuti võib see vahendada efektiivsemat endotsütootilist vabanemist interakteerudes lipiidsete membraanidega (Mäe jt., 2009; Lehto jt., 2011 b).

Eredaimad näited PepFect seeriasse kuuluvatest peptiididest on näiteks stearüül-TP10 ehk PepFect3 (PF3) (tabel 1), mis on efektiivne transportvektor pDNA viimiseks rakukultuuridesse kui ka *in vivo* ning mis indutseerib oluliselt kõrgema geeniekspressiooni võrreldes mittestearüülitud TP10-ga (Lehto jt., 2011 b). PepFect6 (PF6) on väga efektiivne peptiidne vektor siRNA-de transpordiks, mis suurendab endosomaalset vabanemist ning vahendab kiiret ja efektiivset geenide vaigistamist nii rakkudes kui ka *in vivo* erinevates organites (Andaloussi jt., 2011).

#### **1.4.4. PepFect14 pDNA transpordiks**

Antud töös on kasutatud pDNA transpordiks PepFect seeriasse kuuluvat PepFect14 (PF14), mis moodustab mitte-kovalentset komplekseerimisstrateegiat kasutades nanopartikleid SKO-de ning siRNA-dega ning suudab neid efektiivselt erinevatesse rakuliinidesse transportida (Ezzat jt., 2011; Ezzat jt., 2012). PF14 on PF3 analoog, kuid lüsiinid ja isoleutsiinid on asendatud ornitiinide ja leutsiinidega, samuti kannab tema N-terminaalne osa stearüülrühma (Tabel 1). On näidatud, et PF14/ON nanopartiklid kasutavad rakku sisenemiseks retseptor-vahendatud endotsütoosi ning nende sisenemise eest vastutavad klass A *Scavenger* retseptorid (SCARA-d) (Ezzat jt., 2011). SCARA-d on seotud negatiivselt laetud molekulide rakku sisenemisega ning nende inhibeerimine kaotas PF14/ON partiklite bioloogilise aktiivsuse täielikult.

Selleks, et PF14 antud töös edukamalt rakendada *in vivo* transfektsiooniks, on PF14 saanud lisamodifikatsiooni partiklite stabiilsuse ja poolväärtusaja suurendamiseks vereringes. PEG molekul on peptiidile lisatud C-teminaalselt ning nagu eelpool mainitud, on see üldtunnustatud meetod transportvektorite stabiilsuse suurendamiseks vereringes (Perche ja Torchilin, 2013).

**Tabel 1.** TP ja tema modifitseeritud analoogide järjestused.

Peptiid	Järjestus
Transportaan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>
PepFect3	Stearüül- AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>
nsPepFect14	AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-NH <sub>2</sub>
PepFect14	Stearüül- AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-NH <sub>2</sub>



## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Eksperimentaalse töö eesmärkideks on:

- võrrelda PF14 ja nsPF14 pDNA kondenseerimise võimet ning iseloomustada moodustunud nanopartiklite füsikokeemilisi omadusi;
- uurida PF14 ja nsPF14 partiklite bioloogilist aktiivsust; hinnata PF14/pDNA nanopartiklite vahendatud geeniekspressiooni erinevates rakuliinides ning selle kineetikat; rakupopulatsiooni tiheduse mõju PF14/pDNA nanopartiklite vahendatud geeniekspressiooni tasemetele; nanopartiklite poolt transfekteeritud rakkude hulka rakupopulatsioonis ja hinnata PF14/pDNA nanopartiklite toksilisuse profiili;
- kindlaks teha PF14/pDNA nanopartiklite rakkudesse sisenemise mehhanismid
- hinnata pegüleeritud PF14/pDNA nanopartiklite füsikokeemilisi omadusi, nende bioaktiivsust rakukultuuris ning uurida pegüleeritud PF14/pDNA nanopartiklite potentsiaali geeni transpordiks *in vivo* tingimustel.

## 2.2. Materjalid ja metoodika

### 2.2.1. Peptiidi süntees

Töös kasutatud peptiidid sünteesiti astmeliselt 0.1 mmol skaalal automatiseeritud peptiidisüntesaatoriga (Applied Biosystems, ABI433A, USA), kasutades standardset Fmoc-tahke faasi peptiidisünteesi. Pärast sünteesi eemaldati kaitserühm ning pesti välja üleliigsed reagentid. Stearhape (Sigma Aldrich) kinnitati sünteesitud peptiidi N terminusse, kasutades TBTU/HOBt aktivatsiooni dimetüülformamiid/diklorometaanis. Seejärel peptiid lõigati tahkelt kandjalt, kuivatati üleöö ning puhastati RP-HPLC meetodil, puhtust analüüsiti MALDI-TOF massispektromeetria (Applied Biosystems, Voyager DE Pro) abil. Peptiidide süntees viidi läbi molekulaarse biotehnoloogia laboris spetsialistide poolt.

### 2.2.2. Nanopartiklite moodustamine ja analüüs

Peptiid/pDNA nanopartiklite moodustatakse mittekovalentselt, mis on kiire ja lihtne ning põhineb peamiselt katioonse peptiidi omadusel siduda ja kondenseerida negatiivselt laetud pDNA-d nanopartikliteks.

Töös kasutatud nanopartiklite moodustamiseks segati PF14 (100 µM), nsPF14 (100 µM) või PEG1000-PF14 (100 µM) ja 0,5 µg lutsiferaasi kodeerivat pGL3 plasmidi erinevatel peptiid:plasmid laengusuhetel (*Charge ratio*, CR) 0,5:1–4:1 50 µl MQ vees. CR-id arvutati teoreetiliselt, võttes arvesse plasmidi negatiivset laengut ning peptiidi positiivset laengut. Pärast peptiid/pDNA kokkusegamist inkubeeriti komplekse üks tund toatemperatuuril. Pegüleeritud komplekside valmistamisel kasutati erinevaid PEG1000-PF14 peptiidi protsentuaalset osakaalu peptiidide segus, näiteks, 5% PEG1000-PF14 tähendab, et kogu peptiidi kontsentratsioonist moodustab pegüleeritud PF14 5%.

*Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 (LF2000, Invitrogen, Rootsi) reagenti kasutati vastavalt tootja protokollile. Lühidalt, 52,5 µl Opti-MEM-ile lisati 1,3 µl LF2000 reagenti (1 mg/ml) ja teisele samale kogusele Opti-MEM-ile 0,5 µg pGL3 plasmidi. Pärast LF2000 ja pGL3 lahuse 15 minutist inkubatsiooni toatemperatuuril segati need omavahel kokku ning inkubeeriti veel 30 min. toatemperatuuril.

Nanopartiklite moodustumist hinnati kahe erineva analüüsi meetodiga:

- a) peptiidi võimet pDNA-d kondenseerida hinnati esmalt agaros-geelelektroforeesil, kus hinnati vaba pDNA migratsiooni geelil. Selleks moodustati nanopartiklid laengu suhetel 0,5-4 vastavalt üleval pool kirjeldatud protokollile. Siis kanti 10 µl proovi koos 2,5 µl värviga (6xDNA *loading dye*, Fermentas) agarosgeelile (1%, BioTop Agaros,

1-kordses TAE puhvris), millele oli eelnevalt lisatud EtBr (0,5µg/ml). Proove jooksutati 30 min. ning seejärel visualiseeriti (UVIpro Gold, UK).

- b) pDNA kondensatsiooni efektiivsust erinevate peptiidide puhul mõõdeti EtBr fluorestsentsi analüüsil. EtBr on võimeline interkaleeruma nukleiinhapetega ning tema fluorestsentsi on võimalik mõõta. Selleks valmistati peptiid/pDNA kompleksid vastavalt kirjeldatule ning pärast inkubeerimist kanti proovid mustale 96-kaevulisele plaadile (NUNC, Rootsi), neile lisati 135 µl MQ vett ning 15 µl EtBr lahust (EtBr lõpp-kontsentratsioon ~ 400nM) ning inkubeeriti 10 min. toatemperatuuril. Seejärel mõõdeti EtBr fluorestsentsi ( $\lambda_{ex} = 518 \text{ nm}$  ja  $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$ ), kasutades Spectra Max Gemini XS fluoromeetrit (Molecular Devices, Palo Alto, CA). Tulemused on väljendatud suhtelise fluorestsentsina, 100% vastab vaba pDNA fluorestsentsile.

### 2.2.3. Nanopartiklite disintegratsiooni analüüs

Hepariin on suurt negatiivset laengujaotust kandev anioon, mida antud analüüsis kasutatakse pDNA välja tõrjumiseks nanopartiklitest – mida väiksemal hepariini kontsentratsioonil pDNA partiklitest välja tõrjutakse, seda vähem stabiilsemad on partiklid. Selleks, et hinnata partiklite resistentsust hepariinile, inkubeeriti 100 ng pDNA-d sisaldavat peptiid/pDNA partikleid erinevatel hepariini (Sigma-Aldrich, Saksamaa) kontsentratsioonidel 30 min. 37 °C juures. Pärast inkubeerimist proovid analüüsiti, kasutades nii agaros-geel elektroforeesi kui ka EtBr fluorestsentsi meetodit, vastavalt eelnevalt kirjeldatule. EtBr fluorestsentsi analüüsil saadud andmed on antud suhtelise fluorestsentsina, kus 100% vastab vaba pDNA fluorestsentsile EtBr-iga.

Tulemuste kinnitamiseks kasutati spektrofluoromeetrilist hindamist EtBr fluorestsentsi analüüsiga, partiklid moodustati vastavalt üleval kirjeldatule ning pärast ühte tundi inkubatsiooni lisati erinevate kontsentratsioonidega hepariini ja inkubeeriti lisaks 30 min. 37 °C juures. Seejärel lisati EtBr ja mõõtmised viidi läbi nagu EtBr fluorestsentsi analüüsil.

### 2.2.4. Nanopartiklite pinnalaengu ja hüdrodünaamilise diameetri mõõtmine

Hüdrodünaamiline diameeter ja Zeta potentsiaal on kaks olulist karakteristikut, iseloomustamaks nanopartikleid *in vivo* tingimustes, diameetri optimaalne vahemik on 10 - 150 nm ning partiklid peaksid kandma võimalikult neutraalset pinnalaengut, et vältida interaktsioone erinevate vere komponentidega (Davis jt., 2008).

Hüdrodünaamilise diameetri mõõtmine põhineb lahuses olevate osakeste, antud juhul nanopartiklite liikumisel, mis võimaldab mõõta valguse hajuvuse fluktuatsiooni laserkiirega

töötlemisel. Mida suuremad osakesed, seda aeglasemini need liiguvad ning analüüsidest valguse intensiivsuse kõikumisi on võimalik leida osakeste keskmine suurus.

Laetud osakesed adsorbeerivad oma pinnale vastasmärgiga ioone, osa nendest ioonidest moodustavad elektrilise kaksikkihi adsorbse osa, ülejäänud on partikliga nõrgemini seotud ning moodustavad elektrilise kaksikkihi difuusse osa. Potentsiaalide vahet nende kihtide vahel nimetatakse zeta potentsiaaliks. Seda on võimalik mõõta nanopartiklitele elektrivälja rakendamisel, kus zeta potentsiaaliga partikkel liigub vastaslaenguga elektroodi poole kiirusega, mis on proportsionaalne tema zeta potentsiaaliga ning kiiruse mõõtmisel abil on võimalik leida zeta potentsiaal.

Nanopartiklite keskmist hüdrodünaamilist diameetrit ning zeta potentsiaali mõõdeti kasutades DLS (*dynamic light scattering*) Zetasizer Nano ZS aparati (Malvern Instruments, UK). Nanopartiklid moodustati vastavalt protokollile, lühidalt, pDNA kompleksid moodustati 100 µl MQ vees, pDNA lõpp-kontsentratsiooniga 0.01 µg/µl. Pärast 30 min. inkubatsiooni toatemperatuuril DNA kompleksid lahjendati MQ-s, Opti-MEM-is (seerumi lisandiga) või 0,9% NaCl lahuses kuni 500 µl-ni. Seejärel mõõdeti intensiivsus Zetasizer Nano ZS aparatuuril, mis oli seadistatud automaatrežiimile ning igast proovist tehti viis mõõtmist. Kõikide andmete suhteliste intensiivsuste graafikutelt saadi keskmine hüdrodünaamiline diameeter.

Zeta-potentsiaali mõõtmiseks kasutati teisi tingimusi: pDNA kompleksid moodustati MQ vees 300 µl ruumalas, pDNA kontsentratsiooniga 0.01 µg/µl. Pärast 30 min. inkubatsiooni toatemperatuuril, kompleksid lahjendati MQ vees, Opti-MEM-is (seerumi lisandiga) või 0,9% NaCl lahuses kuni 1 ml. Mõõtmisel kasutati Zetasizer Nano ZS aparatuuri, seadistatud automaatses töörežiimis ning igast proovist tehti viis mõõtmist.

### **2.2.5. Kasutatud rakuliinid**

CHO (hiina hamstri munasarja rakud) rakke kasvatati L-glutamiini sisaldavas Ham's F12 (PAA Laboratories, Austria) söötmes, millele oli lisatud 10% FBS-i (veise looteserum, PAA Laboratories, Austria), 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid ( MEM Non-Essential amino acids 100x, PAA Laboratories, Austria) 1,0 mmol/l naatriumpüruvaati (Sodium Pyruvate Solution 100mM, PAA Laboratories, Austria) ning 100 U /ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (Penicillin/Streptomycin 100x, PAA Laboratories, Austria). Rakke kultiveeriti 5% CO<sub>2</sub> sisaldavas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37 °C ja neid külvati ümber 3-4 päeva järel. U2OS (inimese osteosarkoomi rakud), HEK293 (inimese embrüonaalsed neerurakud), HeLa (emakakaela kasvaja rakud), MEF (hiire embrüonaalsed fibroplastid) ja RD4 (inimese skeletilihaste rakud) rakke kasvatati L-glutamiini sisaldavas

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) söötmes millele oli samuti lisatud 10% FBS-i 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid, 1,0 mmol/l naatriumpüruvaati, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. mES (hiire embrüonaalsed tüvirakud) rakke kasvatati kõrge glükoosisisaldusega (4,5 g/l), L-glutamiini sisaldavas DMEM-is, millele oli lisatud 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid, 1,0 mmol/l naatriumpüruvaati, 15% embrüonaalsete tüvirakkude jaoks testitud FBS-i, antibiootikume, 0,1 mmol/l 2-merkaptotetanooli, 1000U/ml leukeemia inhibiitorfaktorit ning mitomütsiin C-d, et inaktiveerida MEF rakkude toiterakkude kiht. Rakke kultiveeriti 5% CO<sub>2</sub> sisaldavas veeauruga küllastatud atmosfääris 37 °C juures.

#### **2.2.6. Plasmidi *in vitro* transport**

Selleks, et hinnata PF14/pDNA nanopartiklite bioloogilist aktiivsust kasutati lutsiferaasi kodeerivat pGL3 plasmidi transfektsiooni erinevatesse rakuliinidesse. Selleks külvati  $5 \times 10^4$  CHO, HEK293, U87, U2OS, RD4, mES ja MEF rakke 24-kaevulistele plaatidele, 24 tundi enne eksperimendi algust. Vahetult enne komplekside lisamist vahetati rakkudelt sööde värsket seerumit sisaldava söötme (+seerum) või seerumit mittesisaldava söötme (-seerum) vastu (450 µl). Siis lisati rakkudele 50 µl peptiid/pDNA erinevatel laengu suhetel moodustatud komplekse, nelja tunni möödudes lisati 1 ml värsket, 10% FBS-i sisaldavat söödet ning rakke inkubeeriti lisaks 20 tundi. Seejärel rakud pesti ning lüüsi kasutades 100 µl 0,1% Triton X-100 lahust PBS-is, 15 minutit 4 °C juures. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks kasutati Promega lutsiferaas analüüsi süsteemi, GLOMAX 96 mikroplaat luminomeetrit. (Promega, Rootsi) ja saadud tulemused normaliseeriti valgusisalduse vastu (Lowry, BioRad, Suurbritannia). LF2000 (Invitrogen, Rootsi) kasutati vastavalt tootja protokollile ning ainult 10% seerumi juuresolekul.

Geeniekspressiooni kestvuse mõõtmiseks transfekteeeriti CHO rakke samuti pGL3 plasmiidiga, kuid lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmised viidi läbi erinevatel ajapunktidel, pärast 4, 8, 24, 48 ja 72 tundi, saadud tulemused normaliseeriti valgusisalduse vastu.

Selleks, et hinnata nanopartiklite võimet transfekteeerida varieeruva tihedusega rakupopulatsioone, külvati 24 tundi enne eksperimendi algust erinev arv rakke ( $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ , and  $10 \times 10^4$ ) 24-kaevulistele plaatidele ning edasine eksperiment viidi läbi vastavalt eelnevalt kirjeldatud protokollile. Kõik tulemused on antud kolme katse keskmisena.

#### **2.2.7 SCARA retseptorite inhibitsioon**

SCARA retseptorite inhibitsiooni jaoks kasutati hästi tuntud SCARA-de inhibiitoreid polüinosiinhapet (pol I), fukoidaani (Fuc) ning dekstraansulfaat (DS), nende kontroll-

ligandideks kasutati inhibiitoritele struktuurselt sarnaseid molekule, kuid millel puudus afiinsus SCARA-de suhtes. Nendeks olid vastavalt polütsütidüülhape (pol C), galaktoos (Gal), kondorotiinsulfaat (CS) (Ezzat jt., 2012). SCARA-de inhibitsiooni eksperimendi jaoks külvati 24 tundi enne eksperimendi algust  $5 \times 10^4$  CHO rakku 24-kaevulisele plaadile. pGL3 plasmiid segati PF14-ga (CR2) ja komplekse inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Enne rakkude transfekkeerimist vahetati sööde värske, 10% seerumit sisaldava ja seerumivaba söötme vastu (450 µl). Seejärel lisati rakkudele erinevad SCARA inhibiitorid ning inkubeeriti 1 tund. Pärast inkubatsiooni inhibiitoritega lisati peptiid/pDNA kompleksid, inkubeeriti lisaks 24 tundi ning seejärel mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust. Erinevate inhibiitorite ligandide ja nende kontrollide kontsentratsioonid valiti vastavalt eelnevalt kirjeldatud tööle (Ezzat jt., 2011). Lühidalt, pol I ja poly C lõpp-kontsentratsiooniga 10 µg/ml, fuc, gal, DS ja CS lõpp-kontsentratsiooniga 5 µg/ml. Tulemused on antud kolme katse keskmisena.

Inhibiitorite ning nende kontroll-ligandide võimet mõjutada PF14/pDNA nanopartikleid ning vaba pDNA-d, kontrolliti agarose-geelelektroforeesil. Selleks moodustati nanopartiklid CR2-l vastavalt protokollile ning neile või vabale pDNA-le lisati rakkude transfektsioonil kasutatud inhibiitorite ja nende kontroll-ligandide kogused ja seejärel inkubeeriti proove 1 tund 37 °C juures. Siis kanti 10 µl proovi koos 2,5 µl värviga (6xDNA *loading dye*, Fermentas) agarosegeelile (1% BioTop Agarose, 1-kordses TAE puhvis), millele oli eelnevalt lisatud EtBr (0,5µg/ml). Proove jooksutati 30 min. ning seejärel visualiseeriti (UVIpro Gold, UK).

### **2.2.8. Spektrofluoromeetriline analüüs**

Selleks, et hinnata ja võrrelda kahe peptiidi (PF14 ja nsPF14) rakku sisenemise efektiivsust, kasutati fluorestsüin-märgistatud plasmidi (Mirus, Saksamaa), mis komplekseeriti peptiidiga vastavalt protokollile ning seejärel transfekkeeriti CHO rakke, mis olid 24 tundi enne eksperimenti külvatud 24-kaevulisele plaadile ( $5 \times 10^4$ ). Märgistatud DNA transfektsiooni efektiivsust hinnati seerumi valkude juuresolekul (10% FBS), kui ka nende puudumisel. Selleks pesti rakke kaks korda PBS-iga ning töödeldi lühidalt trüpsiiniga, et eemaldada rakumembraaniga seotud kompleksid. Seejärel rakud lüüsi 0,1% Triton-X-100 lahusega ning lüsaadid kanti mustale 96-kaevulisele plaadile. Fluorestsentsi mõõdeti lainepikkustel 490/518nm, kasutades Spectra Max Gemini (Molecular Devices, Ameerika Ühendriigid) spektrofluoromeetrit.

### 2.2.9. Läbivoolutsütomeetria

Selleks et teada saada kui suur osa rakupopulatsioonist on PF14/pDNA nanopartiklite vahendusel transfecteeritud, kasutati EGFP-d (*enhanced green fluorescent protein*, roheliselt fluorestseeruv valk) kodeerivat plasmidi ning transfecteeritud rakke analüüsi läbivoolutsütomeetria (FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*). Selleks külvati 24 tundi enne eksperimenti  $5 \times 10^4$  CHO rakku 24-kaevulistele plaatidele. Peptiid/pEGFP kompleksid moodustati laengu suhtel 2 ning transfecteeriti vastavalt eespool kirjeldatud protokollidele. Enne FACS-i analüüsi rakud pesti kaks korda PBS-iga ning seejärel eemaldati nad koekultuuri plaadi küljest, kasutades selleks 0,25% trüpsiin-EDTA lahust (Invitrogen, Rootsi) ning seejärel suspendeeriti jääkülmas PBS-i lahuses, millele oli lisatud 2% FBS-i. Kuni mõõtmiseni hoiti rakke jääl. Fluorestsentsi intensiivsuse analüüsimiseks kasutati firma BD LSRII läbivoolutsütomeetrit (BD Biosciences) ning tarkvara FACSDiva (BD Biosciences, Heidelberg, Saksamaa). Läbivoolutsütomeetri algandmete analüüsiks kasutati programmi GraphPad Prism 5.0. Tulemused on antud kolme katse keskmisena.

### 2.2.10. Rakkude elulemuse määramine

Nanopartiklite võimalikku toksilisust rakkude elulemusele hinnati, kasutades MTS proliferatsiooni analüüsi (*CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, Promega, Rootsi). See kolorimeetriline meetod põhineb metaboolselt aktiivsete rakkude mitokondriaalsete dehüdrogenaaside aktiivsuse detekteerimisel. Dehüdrogenaasid redutseerivad reaktsioonisegus olevad tetrasooliumi soolad formasaaniks ning tekkinud produkti neelduvust on võimalik mõõta spektrofotomeetriliselt. Mida enam metaboolselt aktiivseid rakke on, seda enam substraati redutseeritakse.

Selleks, et mõõta PF14/pDNA nanopartiklite mõju rakkude metaboolsele aktiivsusele, külvati 24 tundi enne eksperimendi algust umbes 70-80% konfluentseks kasvanud CHO ( $1 \times 10^4$ ) rakud 96-kaevulisele koekultuuri plaadile (Greiner Bio One, Saksamaa). Rakke transfecteeriti vastavalt eespool kirjeldatud protokollile, LF2000 kasutati vastavalt tootja protokollile. Enne partiklite lisamist rakkudele vahetati vana sööde 90 µl uue söötme (seerumit sisaldav ning seerumivaba sööde) vastu ning seejärel lisati 1/10 transfectsiooni ruumalast ehk 10µl erinevatel laengu suhetel moodustatud PF14/pDNA partikelid. 4 tunni möödudes lisati täiendavalt seerumit sisaldavat söödet ning inkubeeriti lisaks 20 tundi. Seejärel lisati 20 µl MTS reagenti 100 µl transfectsiooniruumala kohta ning pärast nelja tundi inkubeerimist mõõdeti tekkinud produkti neelduvust 450 nm juures Tecan Sunrise mikroplaadi lugejal (Tecan Trading AG, Šveits) Andmed on esitatud kolme katse keskmisena, 100% vastab töötlemata rakkude elususele.

### 2.2.11. Nanopartiklite transport *in vivo*

Nanopartiklite transpordiks *in vivo* kasutati hiireliini Balb/c (Harlan) emaseid hiiri, vanusega 8 nädalat. Hiiri hoiti kontrollitud temperatuuriga ruumis (20-22 °C) 12-tunnise valguse ja pimeduse tsükli ning loomadel oli vaba juurdepääs toidule ning veele. Kõik hiirtega läbiviidud protseduurid ning eksperimendid kinnitati Eesti Eetikakomitee loaga (luba nr. 69 ja 70, 9 veebruar 2011).

Peptiid/pDNA kompleksid *in vivo* rakendusteks moodustati laengu suhtel 2 (CR2), peptiidi segus moodustas 20% PEG1000-PF14 ning 80% PF14. Plasmiidse DNA doos ühe looma kohta oli 20 µg (0,001 mg/kg). Kompleksid moodustati MQ vees (V=100 µl) ning inkubeeriti 1h toatemperatuuril. Pärast inkubatsiooni lisati komplekside lahusele 100 µl 10,9% mannitooli lahust. Positiivse kontrollina on kasutatud kaubanduslikku transfektsioonireagenti, Turbofecti, vastavalt tootja protokollile, pDNA doosiks oli 20 µg plasmidi looma kohta.

Kompleksid manustati intravenoosselt, kasutades hiire saba veeni. 48 tundi pärast transfektsiooni koguti koed ning homogeniseeriti, uhmerdades, hoides samal ajal kuival jääl. Seejärel lisati 1ml 1X kudede lüüsi puhvrit (Promega, Rootsi) ning loksutati 15 min. Seejärel lüüsitud koed tsentrifuugiti (3 korda, 15000 G, 30 min., +4 °C) ja suspensioonist mõõdeti lutsiferaasi ekspressioon ning normaliseeriti valgusisalduse vastu.



## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Nanopartiklite iseloomustamine

Katioonsed RSP-d on võimelised moodustama pDNA-ga mitte-kovalentselt seotud komplekse (Lehto jt., 2011 b). See põhineb katioonsete ja/või amfipaatsete RSP-de omadusel kondenseerida negatiivselt laetud nukleiinhappeid, sealhulgas pDNA-d, nanosuuruses partikliteks, peamiselt läbi elektrostaatiliste ja/või hüdrofoobsete interaktsioonide.

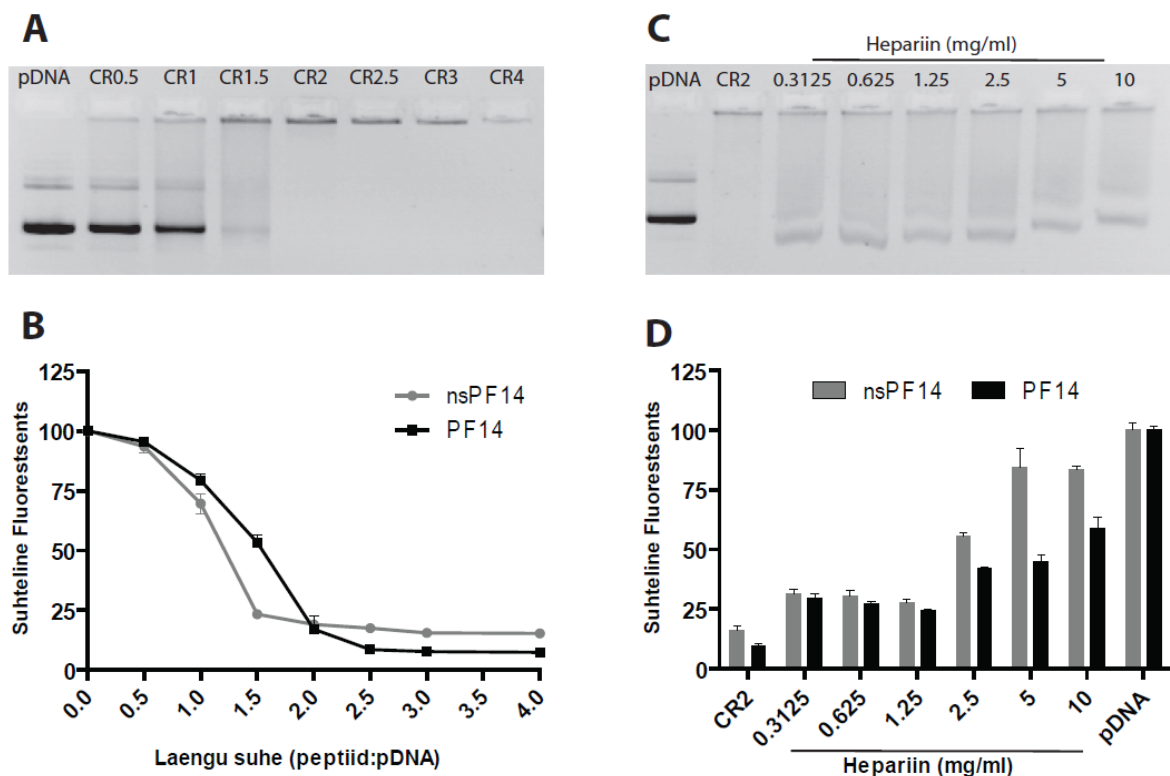
Selleks, et hinnata peptiid/pDNA nanopartiklite moodustumise efektiivsust, segati PF14 pDNA-ga erinevatel laengu suhetel (CR0,5-4) ja analüüsiti geelelektroforeesil. Väiksematel laengu suhetel (0,5-1,5) on näha vaba pDNA migratsiooni geelis, kuid alates CR2-st seotakse NH täielikult partiklitesse (joonis 6A). Neid tulemusi kinnitab ka EtBr fluorestsents-analüüs, kus fluorestsentsi kustumine jõuab platoole alates CR2-st, mis viitab vaba pDNA puudumisele (joonis 6B). Ilma stearüülhappe modifikatsioonita PepFect14 (nsPF14) fluorestsentsi kustumine saavutab platoo alates CR1,5-st (joonis 6B).

Selleks, et peptiid/pDNA partiklid oleksid bioloogiliselt aktiivsed, peavad nad rakku sisenemiseks olema piisavalt stabiilsed, kuid jõudes oma sihtmärgini, peaksid nad olema võimelised pDNA-d kasvõi osaliselt kompleksist vabastama. Selleks, et saada ülevaade nendest omadustest, moodustati peptiid/pDNA nanopartiklid laengu suhtel 2 ning seejärel inkubeeriti neid hepariiniga erinevatel kontsentratsioonidel ning analüüsiti komplekse paralleelselt geelelektroforeesil ning spektrofluoromeetriliselt. Vastavalt vabale pDNA fraktsioonile geelis võib järeldada, et hepariin suudab vähemalt osaliselt välja tõrjuda pDNA-d PF14 partiklitest (joonis 6C). Need tulemused said kinnitust ka spektrofluoromeetrilisel analüüsil, kus hepariini madalamatel kontsentratsioonidel oli vabanenud 30-40% pDNA-st ning 10 mg/ml kontsentratsiooni juures oli vabanenud rohkem kui 50% pDNA-st (joonis 6D). nsPF14 puhul oli rohkem kui 50% pDNA-st vabanenud juba madalamatel hepariini kontsentratsioonidel (2,5 mg/ml) ning kontsentratsiooni suurenedes vaba pDNA fraktsioon tõusis, jõudes kuni 80%-ni kõige kõrgemal hepariini kontsentratsioonil (joonis 6D). Need tulemused näitavad, et võrreldes PF14-ga on nsPF14-ga moodustatud nanopartiklid vähem stabiilsemad.

PF14 nanopartiklite füsikokeemilisi parameetreid mõõdeti DLS-iga (*dynamic light scattering*), mis võimaldab mõõta hüdrodünaamilist diameetrit kui ka partiklite pinnalaengut ehk zeta potentsiaali. Ilmnes, et PF14/pDNA nanopartiklite hüdrodünaamiline diameeter erinevatel laengu suhetel MQ vees jäävad 130-170 nm vahele (tabel 2). Selleks, et mõõta erinevate bioloogiliste vedelike mõju nanopartiklite suurusele, kasutati seerumivaba ning 10%

seerumit sisaldavat Opti-MEM-i. Lahuste lisamisel kasvas partiklite suurus keskmiselt kaks korda. Füsioloogilisel kontsentratsioonil olevate soolade juuresolek põhjustas partiklite agregatsiooni (tabel 2).

PF14/pDNA nanopartiklidel oli tugev negatiivne zeta-potentsiaal, kuni -40mV MQ vees, erinevate lahuste lisamine partiklitele muutis laengut neutraalsemaks, kuigi üldine laeng jäi siiski negatiivseks (tabel 2).



**Joonis 6.** PF14/pDNA nanopartiklite iseloomustamine. A – Peptiidi võimet moodustada komplekse pDNA-ga erinevatel laengu suhetel (CR0,5-CR4) hinnati geelelektroforeesil. B – PF14 ja nsPF14 pDNA kondenseerimise efektiivsuse võrdlus erinevatel laengusuhetel kasutades EtBr fluorestsents-analüüsi. C – PF14 dissotsiatsiooniprofiili hindamine pärast erinevate hepariini kontsentratsioonidega (0,3125 – 10 mg/ml) inkubeerimist, kasutades geel-elektroforeesi. D – PF14 ja nsPF14 nanopartiklite stabiilsuse hindamine hepariiniga inkubeerimisel, kasutades EtBr fluorestsents-analüüsi.

**Table 2.** PF14/pDNA nanopartiklite füsikokeemilised omadused.

Laengu suhe (PF14:pDNA)	Keskmine suurus (nm±SD)	Zeta potentsiaal (mV±SD)
1:1	166±41	-40±5
1.5:1	148±25	-42±1
2:1	134±11	-39±7
3:1	148±54	-24±6
2:1 + Opti-MeM	209±7	-12±3
2:1 + Opti-MeM + FBS	220±120	-26±3
2:1 + NaCl	418±319	-31±4

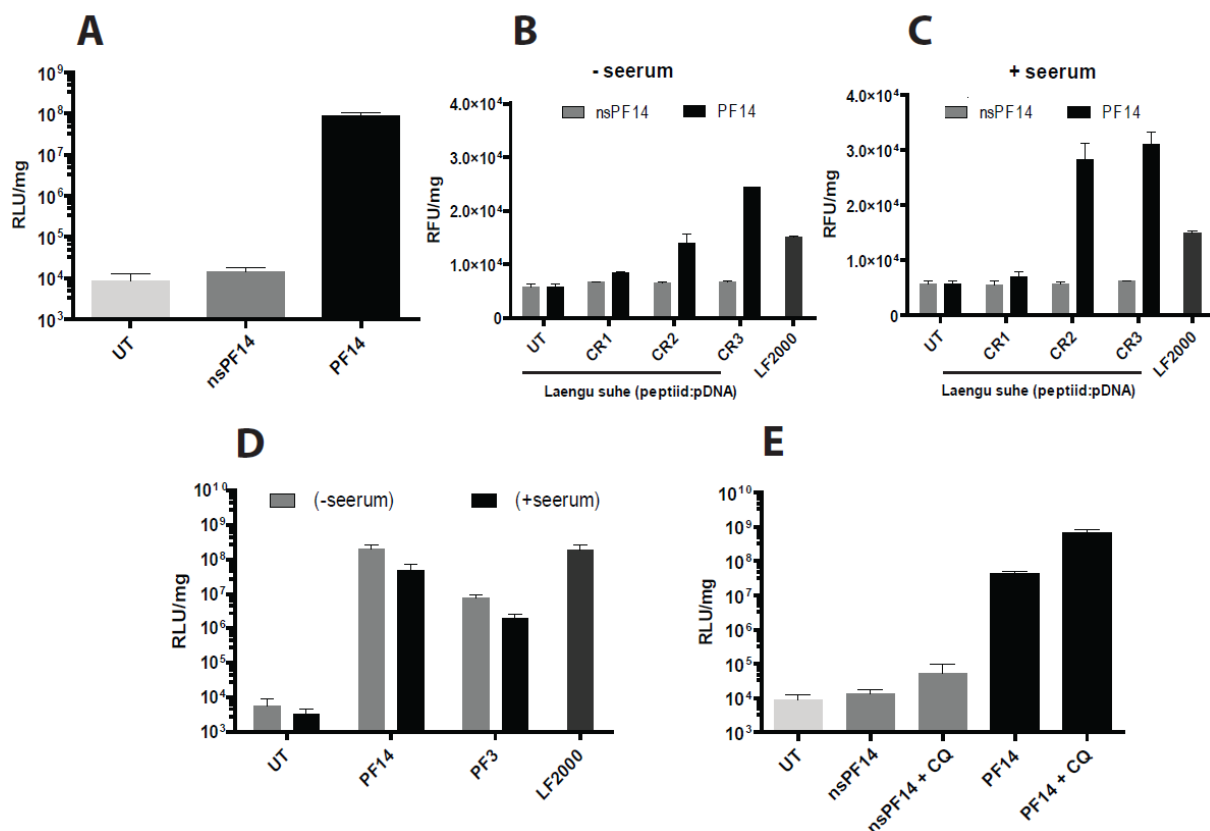
### 2.3.2. Nanopartiklite bioloogiline aktiivsus

Selleks, et hinnata moodustunud peptiid/pDNA nanopartiklite bioloogilist aktiivsust, transfekeeriti CHO rakke lutsiferaasi kodeeriva pGL3 plasmiidiga ning 24 tundi pärast inkubatsiooni mõõdeti rakkudest lutsiferaasi aktiivsus. PF14 nanopartiklid suutsid indutseerida umbes 4 suurusjärku kõrgema lutsiferaasi geeniekspressiooni taseme võrreldes töötlemata (UT, *untreated*) rakkudega, samas nsPF14 jäi umbes samale tasemele kui töötlemata rakudes (joonis 7A). Selleks, et teada saada, kas PF14 ja nsPF14 poolt vahendatud geeniekspressiooni erinevus tuleneb kahe peptiidi erinevusest rakkudesse sisenemisel, kasutati fluorestsiniiga märgistatud plasmidi, mis komplekseeriti peptiid/pDNA laengu suhetel CR1-3 ning transfekeeriti CHO rakke nii seerumi valkude juuresolekul kui ka puudumisel. Fluorestsentsi mõõtmisel selgus, et PF14 suutis rakkudesse viia märgistatud pDNA doosist sõltuvalt, samas nsPF14 ei indutseerinud plasmidi sisenemist rakkudesse. Nii seerumi juuresolekul kui ka puudumisel oli kõige efektiivsem PF14, ületades ka kaubandusliku transfektsioonireagendi LF2000 pDNA transpordi aktiivsuse. (joonis 7B ja 7C).

PF14 nanopartiklite efektiivsust pDNA transpordil võrreldi ka tema eelkäija, PepFect3ga (PF3). PF14/pDNA nanopartiklite vahendusel saadud geeniekspressioon oli PF3-st 20-30 korda efektiivsem seerumi valkude juuresolekul ja puudumisel (joonis 7D).

Kuna RSP-d ning nendega seotud lastmolekulid kasutavad enamasti rakku sisenemiseks endotsütootilisi teid, siis üheks suurimaks takistuseks on endosoomidesse kinni jäämine, mille tõttu suurem osa geneetilisest materjalist tõenäoliselt lagundatakse lüsoosoomides. Selle hindamiseks transfekeeriti CHO rakke lisaks peptiid/pDNA partiklitega (CR2) endosomolüütilise aine, klorokviini (CQ) juuresolekul, mis suurendas PF14/pDNA

nanopartiklite poolt tekitatud geeniekspressiooni lisaks 10 korda. nsPF14 nanopartiklite puhul suurendas CQ samuti bioloogilist aktiivsust, mis viitab sellele, et väike fraktsioon nsPF14 nanopartikleid siiski sisenes rakkudesse ning paiknes endosoomides (joonis 7E). Samuti võib sellest katsest järeldada, et PF14/pDNA nanopartiklid kasutavad rakkudesse sisenemiseks ka endotsütootilisi teid.

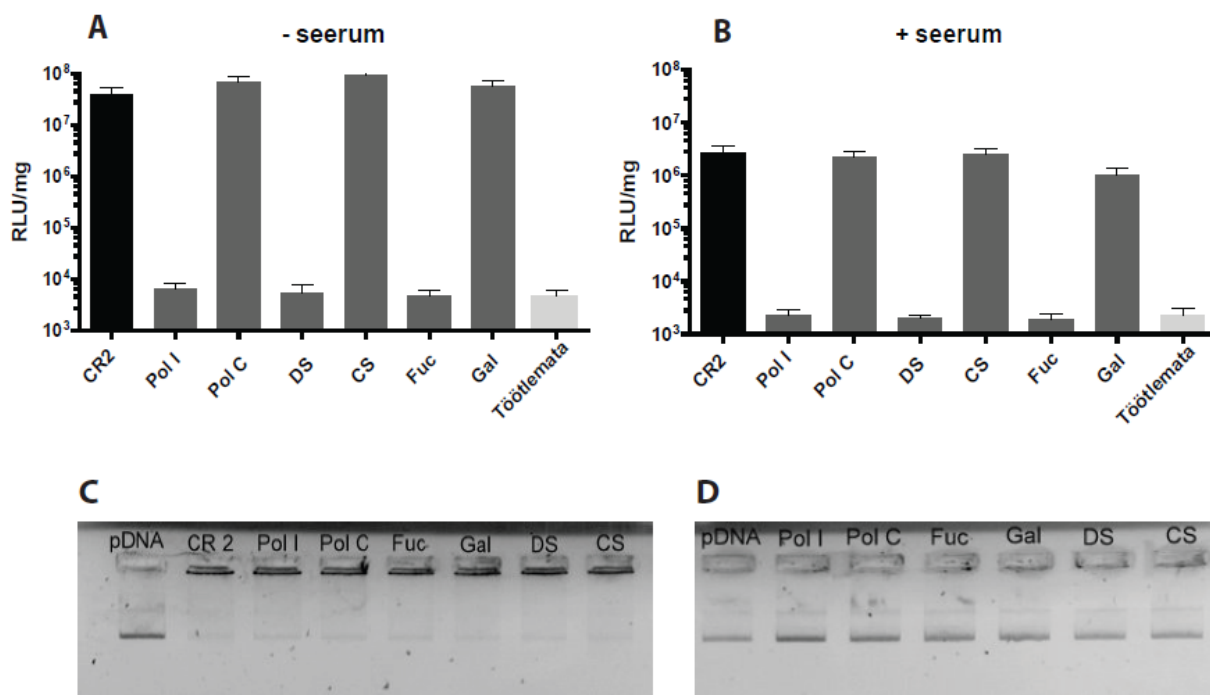


**Joonis 7.** Peptiid/pDNA nanopartiklite bioloogiline aktiivsus. A – PF14 ja nsPF14 nanopartiklite vahendatud geeniekspressioon CHO rakkudes. B – fluorestsiniiga märgistatud pDNA rakku transportimise aktiivsuse võrdlus erinevatel laengu suhetel PF14 ja nsPF14 vahel, seerumi valkude puudumisel ja C – seerumi valkude juuresolekul. D – PF14 ja tema eelkäija, PF3-e transfektsiooni efektiivsuse võrdlus erinevatel CR-idel ning seerumi puudumisel ja juuresolekul. E – endosomolüütilise CQ mõju PF14 ja nsPF14 transfektsiooni efektiivsusele.

### 2.3.3. Nanopartiklite rakkudesse sisenemise mehhanism

Üldiselt on aktsepteeritud, et RSP-d, vähemalt seotuna lastmolekulidega, kasutavad rakkudesse sisenemiseks peamiselt endotsütootilisi teid. Sellest tulenevalt on üks suuremaid biosaadavust vähendavaid tegureid RSP-vahendatud transfektsioonil endoomisesse kinnijäämine. PF14 nanopartiklite inkubeerimine koos klorokviiniga viitas sellele, et PF14/pDNA nanopartiklid, sarnaselt enamikele RSP-dele, sisenevad samuti rakkudesse endotsütoosi teel (joonis 7E). Varasemalt on näidatud, et PF14/ON kompleksid kasutavad rakku sisenemiseks retseptor-vahendatud endotsütoosi, täpsemalt klass A *Scavenger* retseptoreid (SCARA) (Ezzat jt., 2012). Sellest ajendatuna soovisime uurida, kas PF14/pDNA nanopartiklid sisenevad samuti rakkudesse SCARA-de vahendusel. Selleks töödeldi rakke enne pGL3 plasmiidiga transfekteerimist erinevate SCARA inhibiitorite ja nende kontroll-ligandidega ning 24 tundi hiljem mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust. SCARA-de inhibitsioon vaigistas lutsiferaasi geeniekspressiooni tasemed nii seerumit sisaldavates kui ka seerumit mittesisaldavates tingimustes, jäädes samale tasemele töötlemata rakkudega (joonis 8A ja 8B). Seevastu kontroll-ligandid ei vähendanud lutsiferaasi geeniekspressiooni (joonis 8A ja 8B). Saadud tulemused viitavad sellele, et PF14/pDNA nanopartiklid kasutavad samuti rakku sisenemiseks SCARA vahendatud endotsütoosi. prof. Pooga grupi poolt viidi läbi elektronmikroskoopia analüüs, mis näitas, et nanokullaga märgistatud PF14/pDNA nanopartiklid (CR2) kasutavad rakkudesse sisenemiseks kaveoliin-vahendatud endotsütoosi (LISA 1, joonis 1). Need tulemused on kooskõlas varasemalt näidatuga, et SCARA-d kasutavad rakku sisenemiseks kaveoliin-sõltuvat endotsütoosi (Zhu jt., 2011)

SCARA inhibiitorite vahendatud täielikku geeniekspressiooni vaigistamise kinnitamiseks viisime läbi katse hindamaks inhibiitorite ja partiklite omavahelist mõju ning seda, kas inhibiitorid destabiliseerivad komplekse või seondavad vaba pDNA-d. Selleks inkubeerisime PF14/pDNA partikleid inhibiitorite ning nende kontroll-ligandidega ning analüüsisime geelelektroforeesil. Ilmnes, et inhibiitorid ei mõjuta partiklite stabiilsust ega pDNA vabanemist partiklitest (joonis 8C), samuti nad ei seo või ei kondenseeri vaba pDNA-d (joonis 8D).

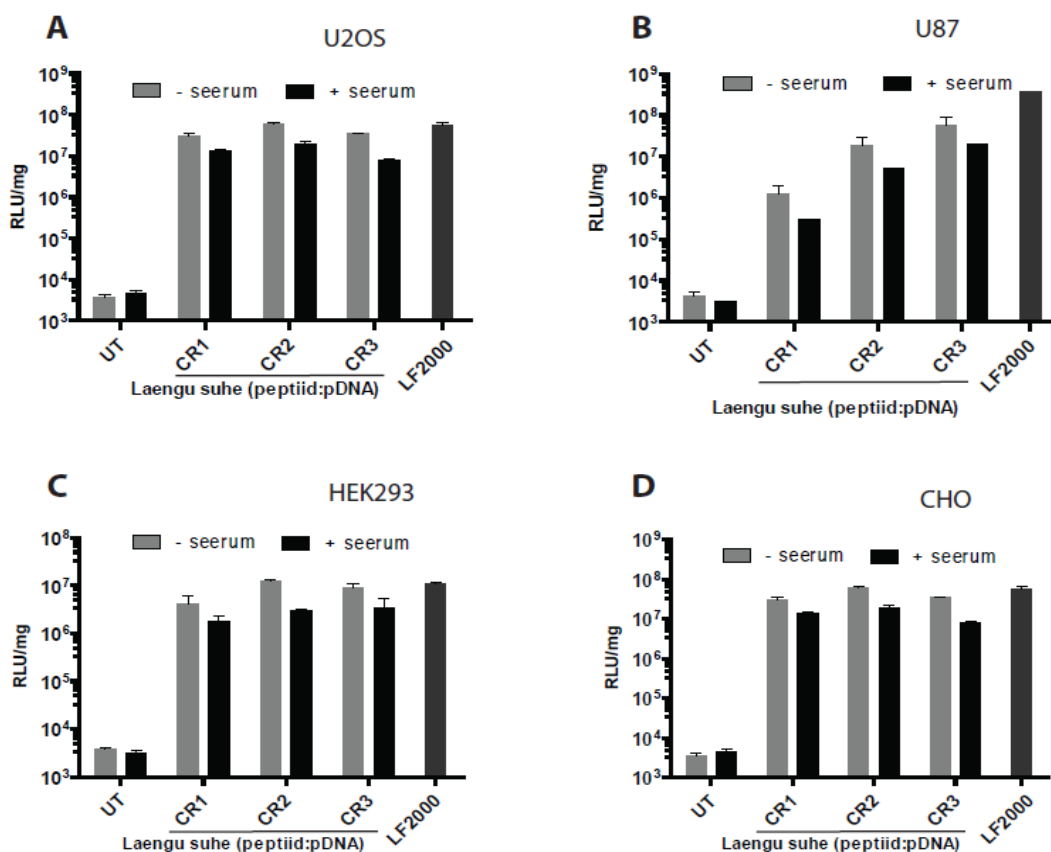


**Joonis 8.** SCARA inhibiitorite mõju PF14/pDNA nanopartiklite transfektsioonile. 24 tundi enne eksperimenti külvati  $5 \times 10^4$  CHO rakku 24-kaevulisele plaadile, üks tund enne transfekkeerimist vahetati sööde, lisati värske seerumivaba või seerumivalke sisaldav sööde ning SCARA inhibiitoreid ning nende kontroll-ligandid, mida inkubeeriti 30 min. 37 kraadi juures. Inhibiitorite ja kontrollide lõpp-kontsentratsioonid olid järgmised: polüinosiinhape (Pol I) ja polüsütidüülhape (Pol C) – 10  $\mu\text{g/ml}$ ; fukoidaan (Fuc), galaktoos (Gal), dekstaansulfaat (DS) ja kondroitiinsulfaat (CS) – 5  $\mu\text{g/ml}$ . Seejärel töödeldi rakke PF14/pDNA nanopartiklitega (CR2) seerumi puudumisel – A ja seerumi juuresolekul – B ning 24 tunni möödudes mõõdeti lutsiferaasi aktiivsus.

Interaktsioonide PF14/pDNA nanopartiklite – C ning vaba pDNA – D ja inhibiitorite ning nende kontroll-ligandide vahel hinnati kasutades geel-elektroforeesi. Partiklid valmistati vastavalt protokollile, seejärel lisati eelnevalt kirjeldatud kontsentratsioonidega inhibiitorid ja nende kontroll-ligandid ning proove inkubeeriti 37 kraadi juures 1 tund. Seejärel kanti proovid agarosgeelile (1% agaros 1  $\times$  TAE puhvris) ning visualiseerimiseks lisati EtBr (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 2.3.4. Nanopartiklite vahendatud geeniekspressioon erinevates rakuliinides.

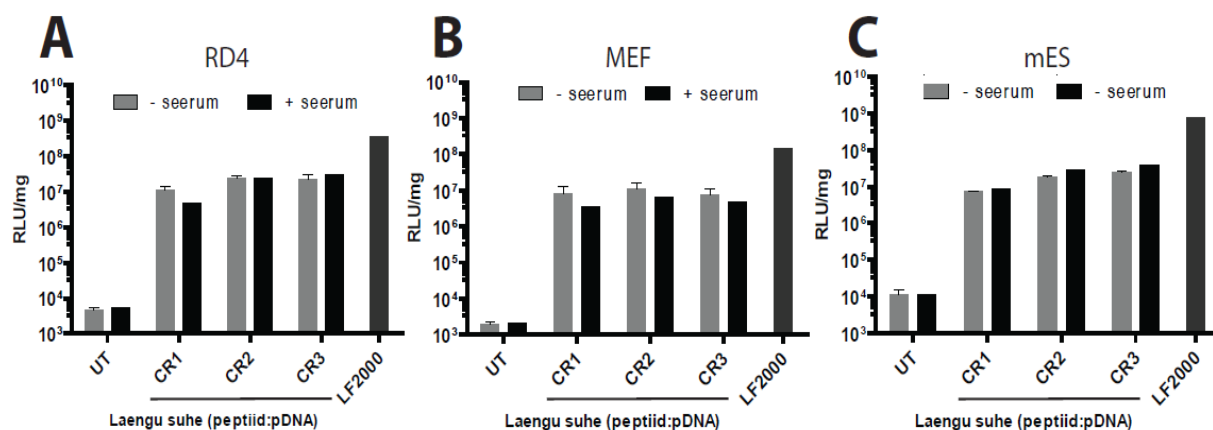
PF14/pDNA nanopartiklid olid võimelised indutseerima geeniekspressiooni tasemed CHO rakkudes (joonis 7), kuid selleks, et näha, kas antud partiklid on võimelised transfekterima ka teisi rakuliine, kaasa arvatud mitmeid vähirakuliine, viidi transfektsioonid läbi inimese osteosarkooma rakuliinis (U2OS, joonis 9A), inimese glioomi rakuliinis (U87, joonis 9B) ning inimese embrüonaalsetes neerurakkudes (HEK293, joonis 9C). Kõikides nendes rakuliinides tekitasid PF14/pDNA nanopartiklid rohkem kui 4 suurusjärgu suuruse geeniekspressiooni kasvu võrreldes töötlemata rakkudega. Võttes arvesse saadud tulemusi erinevates rakuliinides, siis optimaalne laengusuhe oli enamasti CR2 ning peptiidi kontsentratsiooni edasine suurendamine ei mõjutanud märgatavalt geeniekspressiooni tasemeid (joonis 9). Kõikides nendes rakuliinides olid geeniekspressiooni tasemed kõrged isegi seerumivalkude juuresolekul (joonis 9), mis mõningate RSP-de kasutamisel on olnud suureks tagasilöögiks (Palm jt., 2007)



**Joonis 9.** PF14/pDNA nanopartiklite bioloogiline aktiivsus erinevates rakuliinides seerumi juuresolekul ja puudumisel, võrdluseks on kasutatud kaubanduslikku transfektsioonireagenti, LF2000. A –  $5 \times 10^4$  U2OS, B –  $5 \times 10^4$  U87, C –  $5 \times 10^4$  HEK293 ja D –  $5 \times 10^4$  CHO rakud transfekteriti ja analüüsiti vastavalt eelnevalt kirjeldatule, LF2000 kasutati vastavalt tootja protokollile.

### 2.3.5. Nanopartiklite geeniekspressioon raskesti transfekteeeritavates rakuliinides.

Geeni transportvektorid peavad vastama mitmetele nõudmistele, üheks selliseks on võime indutseerida oluliselt kõrgeid geeniekspressiooni tasemeid ka raskesti transfekteeeritavates rakkudes ning primaarsetes rakkudes. Selleks, et uurida kas PF14/pDNA nanopartiklid on võimelised geenitranspordiks nendes rakkudes, valiti kolm rakuliini. Kõigepealt transfekteeeriti RD4 skeletilihaste rakke, kus PF14/pDNA nanopartiklid saavutasid rohkem kui 1000 kordse geeniekspressiooni tõusu võrreldes töötlemata rakkudega ning ekspressioon oli kõrge ka seerumivalkude juuresolekul (joonis 10A). PF14 nanopartiklid vahendasid ka olulist geeniekspressiooni tõusu hiire embrüonaalsetes fibroplastides (MEF) ning embrüonaalsetes tüvirakkudes (mES), kus lutsiferaasi tase kasvas 1000-10 000 korda (joonis 10 B ja C). Kõigi kolme rakuliini puhul oli optimaalne laengu suhe 2, edasine peptiidi kontsentratsiooni suurendamine ei avaldanud olulist mõju geeniekspressiooni suurenemisele. Kuigi lipofektsioon saavutas kõikidel juhtudel kõrgemad geeniekspressioonitasemed kui PF14-vahendatud transfektsioon (joonis 10A), on teada, et ta on seotud toksiliste kõrvalmõjudega (joonis 11D).



**Joonis 10.** PF14-vahendatud pDNA transport raskesti transfekteeeritavatesse ja primaarsetesse rakuliinidesse. A –  $5 \times 10^4$  RD4, B –  $3 \times 10^4$  MEF ja C –  $5 \times 10^4$  mES rakud transfekteeeriti ja analüüsiti vastavalt eelnevalt kirjeldatule, LF2000 kasutati vastavalt tootja protokollile.



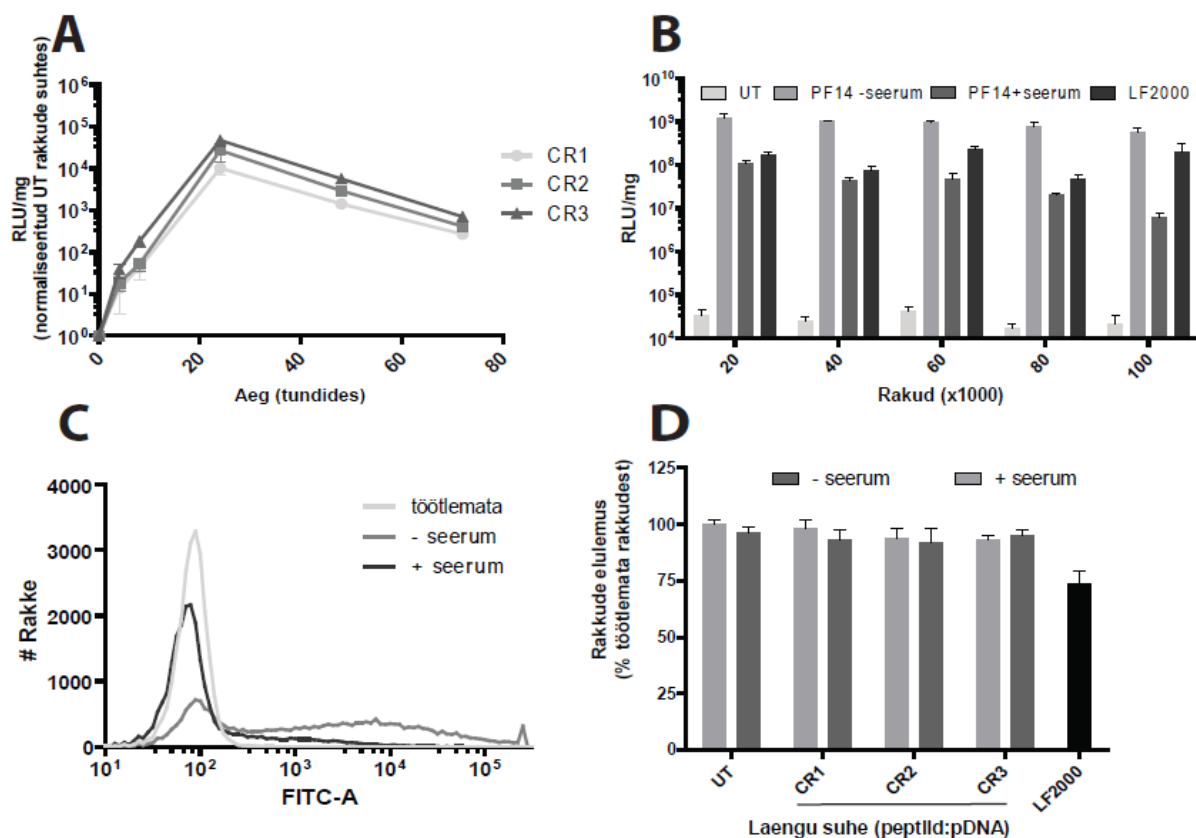
### 2.3.6. Nanopartiklite vahendatud geeniekspressiooni kirjeldamine

Nanopartiklite puhul on väga oluline teada aega, mille jooksul hakkab geeniekspressioon transfekteeeritud rakkudes vähenema. Selle väljaselgitamiseks transfekteeeriti CHO rakke ja mõõdeti lutsiferaasi ekspressiooni erinevatel ajapunktidel – 4, 8, 24, 48 ja 72h. Juba pärast nelja tundi suurenes geeniekspressioon 10 korda, jõudes maksimumi 24 tunni möödudes. Alates sellest ajapunktist hakkas geeniekspressioon kahanema, pärast 72 tundi oli see vähenenud 10 korda (joonis 11A).

Järgmiseks oluliseks kriteeriumiks on transfektsioonivektori võime transfekteeerida erineva tihedusega rakupopulatsioone ühtlase efektiivsusega. Selle hindamiseks külvati 24-kaevulisele plaadile erinevate tihedustega rakud (20 000 – 100 000 rakku), mis transfekteeeriti ning analüüsiti lutsiferaasi ekspressioon suhtes. Ilmnes, et rakupopulatsiooni konfluentsusel puudus oluline mõju geeniekspressiooni tasemetele, lutsiferaasi ekspressioon jäi enamasti samale tasemele nii seerumi puudumisel kui ka juuresolekul, nii ka LF2000 puhul (joonis 11B).

Lisaks erineva tihedusega rakupopulatsioonide transfekteeerimisele on ka väga oluline, et transportvektor suudaks transfekteeerida suure osa rakke tervest populatsioonist. Selle hindamiseks transfekteeeriti CHO rakke roheliselt fluorestseeruvat valku (EGFP) kodeeriva plasmidi, pEGFP-ga ning analüüsiti ekspressiooni läbivoolutsütomeetril. PF14 nanopartiklite vahendatud transfektsioon seerumit mittesisaldavates tingimustes suurendas EGFP ekspressiooni enamikes rakkudes rakupopulatsioonis, seevastu seerumit sisaldavates tingimustes ekspresseeris EGFP-d väiksem fraktsioon rakke (joonis 11C).

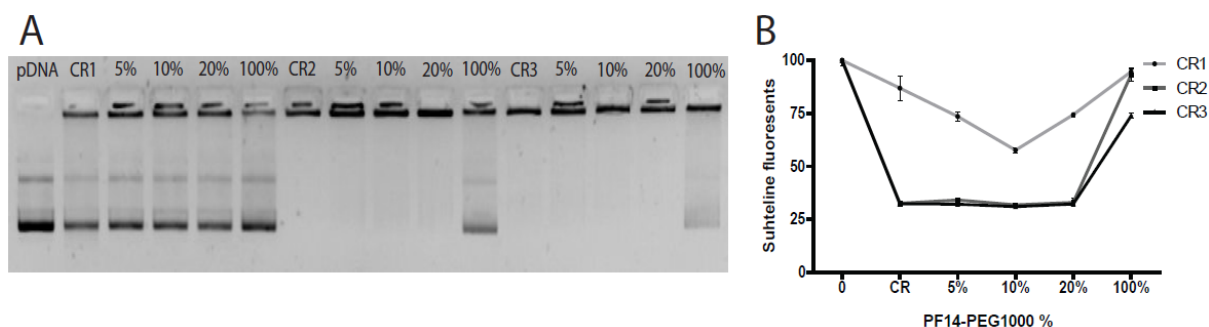
Transfektsioonivektorite puhul on oluline, et nad oleksid võimelised transportima geneetilist materjali rakkudesse võimalikult ohutult ning toksiliste kõrvaltoimete puudumine või kergus on ka üheks eelduseks nende potentsiaalseks kasutamiseks ravimitena. Selle esmaseks hindamiseks transfekteeeriti CHO rakke PF14/pDNA nanopartiklitega ning hinnati nende elulemust MTS analüüsiga. Vastavalt sellele ei põhjustanud PF14 nanopartiklid rakkudele toksilisust erinevatel laengu suhetel ning seerumi valkude puudumisel kui ka juuresolekul. Seevastu kaubanduslikult kasutatav LF2000 vähendas rakkude elulemust kuni 30% (joonis 11D).



**Joonis 11.** PF14/pDNA nanopartiklite vahendatud geeniekspressiooni kineetika, geeniekspressiooni taseme sõltuvus rakupopulatsiooni konfluentsusest, võime transfekteeida rakke rakupopulatsioonis ning toksilisuse profiili hindamine CHO rakkudes. A – PF14/pDNA nanopartiklite poolt indutseeritud geeniekspressiooni kineetika hindamiseks transfekteeiti CHO rakud pGL3 plasmiidiga CR2 juures ning rakkude lutsiferaasi ekspressiooni analüüsi erinevatel ajapunktidel, 4 -72 tunni vahel. B – selleks, et hinnata rakupopulatsiooni konfluentsuse mõju transfektsioonile, külvati erineva tihedusega rakud ( $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  ja  $100 \times 10^4$ ) 24 tundi enne eksperimenti ning seejärel transfekteeiti ning analüüsi vastavalt eespool kirjeldatule. C – Selleks, et hinnata PF14/pDNA nanopartiklite efektiivsust terve rakupopulatsiooni transfekteeimisel, viidi pEGFP plasmid CHO rakkudesse ning seejärel analüüsi neid läbivoolutsütomeetrial. D – PF14/pDNA toksilisust rakkudele hinnati MTS proliferatsiooni analüüsil, CHO rakud transfekteeiti ning rakkude elulemust mõõdeti 24 tundi pärast transfektsiooni.

### 2.3.7. Pegüleeritud nanopartiklite iseloomustamine

Selleks, et suurendada PF14 nanopartiklite biosaadavust *in vivo* tingimustel, kasutati PEG molekuli lisamist ehk pegüleerimist. Pärast PEG molekuli kovalentset konjugeerimist PF14-e külge oli vaja hinnata, kas PEG1000-PF14 on samuti võimeline pDNA-d kondenseerima. Selleks viidi läbi agarose-geelelektroforees ning ilmnes, et laengu suhtel 1 ning erineva PEG1000-PF14 protsentuaalse hulga juures pDNA-d ei kondenseerita efektiivselt, kuid alates CR2-st on pDNA kondenseeritud partikliteks, välja arvatud 100% PEG1000-PF14 puhul, kus on näha vaba pDNA migreerumist geelil (joonis 12A), sarnaselt CR2-le on pDNA kondenseeritud ka CR3 juures, kuid 100% juures on samuti näha vaba pDNA migreerumist geelil (joonis 12A). Neid tulemusi kinnitab ka EtBr fluorestsents-analüüs, kus on näha CR1 puhul ebaefektiivset pDNA kondensatsiooni. Alates CR2-st jõuab pDNA kondensatsioon platoole, kuid 100% PEG-PF14/pDNA partiklite puhul on see jällegi peaaegu võrdne vaba pDNA fluorestsentsiga (joonis 12B).



**Joonis 12.** Pegüleeritud PF14/pDNA nanopartiklite moodustumine. A – Peptiidi võime kondenseerida pDNA-d nanopartikliteks erinevatel laengu suhetel (CR1-CR3) ning pegüleeritud peptiidi erinevatel protsentuaalsetel koostistel. B – PEG1000-PF14 /pDNA kondenseerimise efektiivsuse hindamine, kasutades EtBr fluorestsents-analüüsi. Pegüleeritud nanopartiklite füsikokeemiliste parameetrite mõõtmine näitas, et PEG1000-PF14/pDNA nanopartiklite hüdrodünaamiline diameeter laengu suhtel 2 ja erinevatel pegüleeritud PF14 kontsentratsioonidel MQ vees jäävad 80-200 nm vahele (tabel 3), suurendades PEG1000-PF14 osakaalu, suureneb ka partikli hüdrodünaamiline diameeter. PEG1000 lisamine PF14/pDNA nanopartiklitele muutis PF14 partiklite zeta-potentsiaali positiivseks, kuni 30mV MQ vees, välja arvatud 100% PEG1000-PF14/pDNA nanopartiklite puhul, mis omasid tugevat negatiivset laengut (tabel 3).

**Tabel 3.** . PEG1000-PF14/pDNA nanopartiklite füsikoemilised omadused.

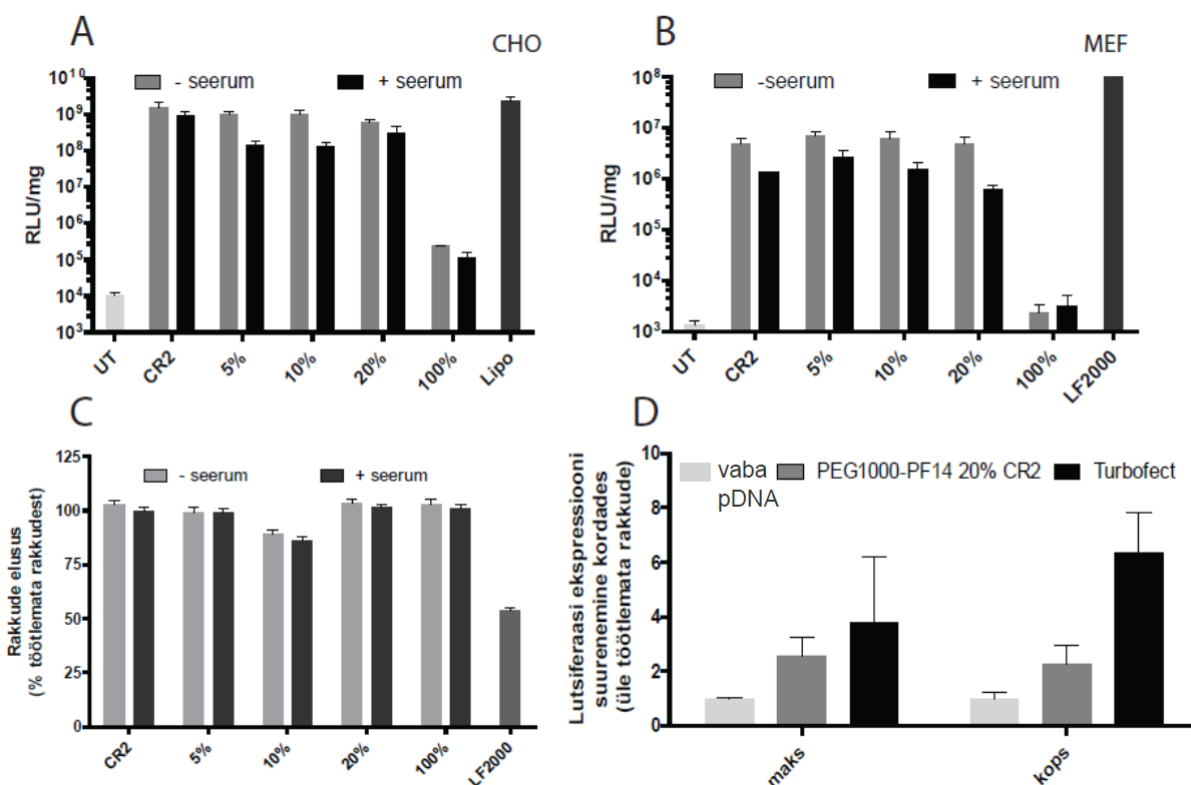
PEG1000-PF14 % (PF14st )	Keskmine suurus (nm±SD)	Zeta potentsiaal (mV±SD)
2,5	101 ± 27	30±11
5	153 ± 64	12±26
7,5	135 ± 59	21±27
10	170 ± 64	14±38
20	184 ± 56	8±19
100	207 ± 6	-53±8

### 2.3.8. Geenitransport pegüleeritud nanopartiklitega

Selleks, et hinnata pegüleerimise mõju PF14/pDNA nanopartiklite bioloogilisele aktiivsusele, viisime läbi transfektsioonid CHO ning MEF rakkudes ning ilmnas, et kummaski rakuliinis oli pegülatiooni mõju nanopartiklite transfektsioonidele minimaalne (joonis 13A ja 13B), olles sarnane PF14-vahendatud partiklite geeniekspressiooni tasemetega (vastavalt joonis 9D ja 10B), välja arvatud 100% PEG1000-PF14/pDNA nanopartiklite vahendatud geeniekspressioon, mis oli oluliselt vähenenud (joonis 13A ja 13B) ning mis võib tuleneda ilmselt ebaefektiivsest pDNA kondensatsioonist (joonis 12A ja 12B).

Enne nanopartiklite *in vivo* transfektsiooni hinnati pegüleeritud nanopartiklite mõju ka rakkude elulemusele. Selleks transfecteeriti CHO rakke peptiid/pDNA nanopartiklitega (CR2) ning pegüleeritud peptiidi erineva protsentuaalse koostise juures ning hinnati nende elulemust MTS analüüsiga. Vastavalt sellele ei põhjustanud pegüleeritud PF14 nanopartiklid rakkudele toksilisust ning elulemust ei mõjutanud ka transfektsioonid seerumi valkude puudumisel kui ka juuresolekul (joonis 13C).

Viimasena hindasime pegüleeritud partiklite lutsiferaasi ekspressiooni indutseerimise võimet loomudelisel mudelis, mida võrdlesime kaubandusliku *in vivo* rakenduste jaoks mõeldud katioonsetel polümeeridel põhineva transfektsioonireagendi, Turbofectiga. Pegüleeritud PF14/pDNA nanopartiklid olid võimelised indutseerima 2,5 korda kõrgemaid geeniekspressiooni tasemeid maksas ning umbes 2 korda kõrgemaid geeniekspressiooni tasemeid kopsus, võrreldes vaba pDNA kontrolltasemetega (joonis 13D). Turbofect indutseeris ~3,5 korda suuremad lutsiferaasi tasemed maksas ning ~6 korda suuremad ekspressioonitasemed kopsus (joonis 13D).



**Joonis 13.** Pegüleeritud nanopartiklite bioaktiivsus ning toksilisus. Pegüleeritud nanopartiklite võime indutseerida pDNA ekspressiooni rakukultuuris, A – CHO rakkudes ning B – MEF rakkudes.  $5 \times 10^4$  rakke külvati 24 tundi enne eksperimendi algust 24-kaevulistele plaatidele ning seejärel transfecteeriti laengu suhtel 2, erinevate PEG1000-PF14 peptiidi protsentuaalse osakaalu juures. C – Pegüleeritud nanopartiklite mõju rakkude elulemusele, 100% rakkude elulemus vastab töötlemata rakkude elulemusele. D – pegüleeritud PF14 nanopartiklite võime indutseerida geeniekspressiooni *in vivo*. Kompleksid moodustati laengu suhtel 2 (CR2), peptiidi segus moodustas 20% PEG1000-PF14 ning 80% PF14. pDNA doos ühe looma kohta oli 20 µg. Komplekse inkubeeriti üks tund toatemperatuuril. Pärast inkubatsiooni lisati nanopartiklite lahusele sama kogus 10,9%-list mannitooli lahust. Positiivse kontrollina on kasutatud kommertsiaalset transfectsioonireagenti, Turbofecti, vastavalt tootja protokollile, pDNA doosiks oli 20 µg plasmidi looma kohta. Kompleksid manustati intravenoosselt, kasutades hiire saba veeni. 48 tundi pärast transfectsiooni koguti koed, homogeniseeriti ning mõõdeti lutsiferaasi ekspressioon, mis normaliseeriti valgusisalduse vastu.

## 2.4. Arutelu

Geeniteraapia rakendusteks on vaja leida efektiivne ning ohutu vektori terapeutiliste nukleiinhapete transpordiks rakkudesse. Viraalsed vektorid on väga efektiivsed, kuid nende kasutamisega kaasnevad riskid nagu immunogeensus ning kantserogeenne mutagenees. Mitteviraalsed vektorid põhinevad sünteetilistel lipiididel, polümeeridel või peptiididel, mis suudavad pDNA-d kondenseerida nanopartikliteks ning vahendada nende transporti rakukultuuris ja organismi tasemel (Midoux P., 2009).

RSP-d on peptiidsed ühendid, mis võimaldavad erinevate lastmolekulide efektiivset transporti rakkudesse nii *in vitro* kui *in vivo* tingimustes. RSP-sid on võimalik kasutada mitmetes geeniteraapia rakendustes, kuid nende bioloogilist aktiivsust vähendavad ebaefektiivne pDNA kondenseerimine nanopartikliteks ning nende ebastabiilsus. Isegi kui stabiilsed nanopartiklid moodustuvad, siis suurimaks tagasilöögiks on nende kinnijäämine endosomaalsetesse vesiikulitesse. On näidatud, et RSP-de efektiivsus pDNA kondenseerimisel ning membraanide destabiliseerimisel võib oluliselt tõsta nende modifitseerimine hüdrofoobse stearüülhappe lisamisega (Lehto jt., 2011)

Antud töö eesmärgiks oli uurida, kas SKO-de transpordi jaoks välja töötatud RSP, PepFect14 (Ezzat jt., 2011), on efektiivne pDNA transpordil, seejärel iseloomustada nende komplekside füsikokeemilisi parameetreid ning vektori vahendatud geeniekspressiooni erinevates rakuliinides, samuti kindlaks teha rakku sisenemise mehhanismid ning saada esmakordselt aimu PF14-vahendatud NH-de transpordist *in vivo*

Esiteks iseloomustati PF14/pDNA nanopartiklite füsikokeemilisi omadusi ning erinevate analüüsidega ilmnes, et PF14 moodustab stabiilseid nanopartikleid pDNA-ga erinevatel laengusuhetel, kusjuures CR2 juures oli kogu pDNA partiklitesse seotud. DLS näitas, et CR2 juures moodustatud nanopartiklite hüdrodünaamiline diameeter on keskmiselt 135 nm ning erinevatel CR-idel suurus varieerub 130-170 nm. (tabel 2). Nanopartiklite pinnalaeng CR2 juures oli keskmiselt -40mV (tabel 2).

Selleks, et pDNA nanopartiklid suudaksid olla bioloogiliselt aktiivsed, peavad nad olema kuni sihtmärgini jõudmiseks piisavalt stabiilsed, kuid kohale jõudes peab lastmolekul olema võimeline nanopartiklist vabanema. PF14/pDNA nanopartiklite stabiilsuse testimiseks inkubeeriti neid hepariiniga, kus teda kasutati pDNA-d kompleksidest välja tõrjuva polüanioonina. Ilmnes, et PF14 moodustas stabiilsemaid nanopartikleid kui nsPF14, kuid kõrgematel hepariini kontsentratsioonidel vabanes pDNA ka PF14 nanopartiklitest, mis näitab, et pDNA-d on võimalik partiklitest välja tõrjuda, ning see võimaldab geeniekspressiooni pDNA-lt (joonis 6). Saadud andmetest võib järeldada, et nsPF14/pDNA partiklid on

bioloogiliselt inaktiivsed vähese stabiilsuse tõttu. Antud töös leitud tulemused on kooskõlas varasemate uuringutega (Lehto jt., 2011 b), kinnitades, et lisaks elektrostaatilistele interaktsioonidele on ka hüdrofoobsed interaktsioonid vajalikud RSP/pDNA partiklite moodustumisel, stabiilsusele kui ka NH transpordi potentsiaalile.

On laialdaselt aktsepteeritud, et RSP-d, eriti lastmolekulidega seotuna, kasutavad rakku sisenemiseks endotsütootilisi teid, jäädes seetõttu endosomaalsetesse vesiikulitesse kinni, mis on põhiliseks biosaadavust limiteerivaks faktoriks nende lastmolekulide toimekohal (rakutuum pDNA puhul). Üheks levinumaks strateegiaks endosoomidest materjali vabastamiseks on rakkude töötlemine klorokviiniga, mis on tuntud endosomolüütiline aine (Erbacher jt., 1996). CQ võimaldab endotsütoosi teel rakku sisenenud nanopartiklitel vabaneda endotsütootilistest vesiikutest, suurendades seega nende transfektsiooni efektiivsust, ning seetõttu geeniekspressiooni suurenemine PF14/pDNA CQ juuresolekul viitab nende partiklite rakkudesse sisenemisele endotsütoosi teel (joonis 7E).

Et saada täpsemat ülevaadet partiklite rakusisest liikumisest, viisid Prof. Pooga ja tema töögrupp läbi TEM (transmissiooni elektronmikroskoopia) analüüsi, transfekterides CHO rakke nanokullaga märgistatud pGL3/PF14 nanopartiklitega ning see näitas kaveool-sõltuva endotsütoosi osalust PF14/pDNA nanopartiklite rakku sisenemisel (Lisa 1; joonis 1). Kaveoliin-sõltuva endotsütoosi osalus on näidatud ka TP10/valk komplekside transpordi puhul (Säälik jt., 2009). Varasemalt on näidatud, et PF14/ON partiklite sisenemine rakkudesse on seotud *Scavenger* retseptorite klass A alatüüpidega (Ezzat jt., 2012), sama kehtib ka PF14/pDNA nanopartiklite sisenemise kohta rakkudesse, kus SCARA alagruppide inhibeerimine vaigistas geeniekspressiooni täielikult (joonis 8A ja B). Samuti on näidatud, et SCARAd on seotud kaveoliin-sõltuva endotsütoosiga (Zhu jt., 2011).

PF14/pDNA nanopartiklid vahendasid märkimisväärsede geeniekspressiooni tasemete teket erinevates rakuliinides kuni 4 suurusjärku. Transpordi efektiivsust ei mõjutanud oluliselt ka seerumi valkude juuresolek (joonis 9), mis on olnud suur takistus erinevate RSP-de rakendamisel. Võrreldes PF14 tema eelkäija PF3-ga, mis on samuti efektiivne pDNA transportija (Lehto jt., 2011 b), on PF14-l oluliselt paranenud transpordiomadused, indutseerides vähemalt ühe suurusjärgu kõrgemad geeniekspressiooni tasemed (joonis 7D). PF14-vahendatud geeniekspressioon tekib kiiresti, juba pärast nelja tundi on see kasvanud 10 korda, jõudes maksimumini 24 tunni möödudes (joonis 11A) ning kõrgete geeniekspressiooni tasemete saavutamine ei sõltu rakkude konfluentsusest (joonis 11B). PF14 nanopartiklitel puudub mõju rakkude elulemusele (joonis 11D) ning nad on võimelised transfekterima ka raskesti transfekteritavaid ning primaarseid rakukultuure (joonis 10), seda isegi seerumi valkude juuresolekul.

*In vivo* rakendustes stabiilsust suurendava PEG molekuli konjugeerimine peptiidile võimaldab *in vivo* indutseerida 2,5 korda kõrgema geeniekspressiooni taseme maksas ning umbes 2 korda kõrgema geeniekspressiooni taseme kopsus, võrreldes loomadega, kellele oli antud paljast pDNA-d, intravenoossel manustamisel (joonis 13D).

Kokkuvõtteks, PF14 on efektiivne transportvektor pDNA rakkudesse viimiseks, millel on mitmeid eeliseid võrreldes traditsiooniliste vektoritega. Antud töös esitatud PF14 vahendatud *in vivo* transfektsioon on esimene näide PF14 nanopartiklite rakendamisel *in vivo* mudelis, viidates tema potentsiaalsetele rakendustele geeni transpordiks haigusmudelites.



## KOKKUVÕTE

Üks suurimaid väljakutseid geeniteraapias on leida efektiivne ning ohutu meetod rakuväliste ja rakusiseste barjäärid ületamiseks, eesmärgiga toimetada geneetiline materjal raku sisekeskkonda. Funktsionaalne geen sisestatakse tavaliselt plasmiidsesse DNA-sse, mis viiakse viraalsete või mitteviraalsete transportvektorite vahendusel rakkudesse. Viraalsed vektorid on efektiivsed kuid patogeense päritolu tõttu on nad alati seotud potentsiaalsete kõrvaltoimetega, seetõttu on välja töötatud erinevaid mitteviraalseid vektoreid. Üheks selliseks klassiks on rakku sisenevad peptiidid, mille puhul on näidatud pDNA transporti rakukultuuris kui ka *in vivo* tingimustes. Antud töös on kasutatud geneetilise materjali kandjana RSP-d, PepFect14 (PF14) eesmärgiga hinnata PF14/pDNA nanopartiklite omadusi ning nende potentsiaali bioloogilistes rakendustes.

Saadud tulemused demonstreerivad, et PF14 on võimeline kondenseerima pDNA-d erinevatel laengu suhetel ning moodustama negatiivselt laetud, stabiilseid nanopartikleid suurusega 130-170 nm. Nanopartiklid suudavad indutseerida kõrgeid geeniekspressiooni tasemeid erinevates rakuliinides, sealhulgas raskesti transfekteeitavates rakkudes, mõjutamata rakkude elulemust. Transfektsiooni efektiivsus ei vähene seerumi valkude juuresolekul ning on suhteliselt sõltumatu rakupopulatsiooni tihedusest. Tähelepanuväärselt, PF14 modifitseerimine polüetüleenglükooliga suurendab peptiidi potentsiaali pDNA transportimisel *in vivo* tingimustes.

Kokkuvõtteks, PF14 on efektiivne transfektsioonireagent geneetilise materjali transportimiseks rakkudesse, mida saaks kasutada potentsiaalse transportvektorina prekliinilistes haigusmodelites nukleiinhapetel põhinevates terapeutilistes rakendustes.

## Cell penetrating peptide, PepFect14, for efficient gene delivery *in vitro* and *in vivo*

Kadi-Liis Veiman

### SUMMARY

One of the major challenges in implementing gene therapy is to find efficient and safe measures how to deliver genes. Easiest way for introducing genetic material to cells is to incorporate the gene of interest into plasmid DNA (pDNA) and deliver this DNA into cells. Cell-penetrating peptides (CPPs) are one class of non-viral delivery vectors that have been shown to facilitate the delivery of pDNA, both *in vitro* and *in vivo*. They can condense oligonucleotides and plasmid DNA into nanoparticles, thus allowing the transfection of genetic material into cells. However, despite few promising attempts, CPP-mediated pDNA delivery has been relatively inefficient due to the unfavorable nanoparticle characteristics or the nanoparticle entrapment to endocytic compartments. In many cases, both of these drawbacks could be alleviated by modifying CPPs with a stearic acid residue.

In this study, PepFect14 (PF14) peptide, previously used for the transport of shorter oligonucleotides, is demonstrated to be suited also for the delivery of pDNA. It is shown that PF14 forms stable nanoparticles with pDNA at different peptide/pDNA charge ratios with a negative surface charge and size of around 130–170 nm. These nanoparticles facilitate efficient gene delivery and expression in a variety of regular adherent cell lines and also in difficult-to-transfect primary cells. Uptake studies indicate that PF14/pDNA nanoparticles are utilizing class A scavenger receptors (SCARA) and caveolae-mediated endocytosis as the main route for cellular internalization. Moreover, the potential of PF14 nanoparticles to induce gene expression levels in animal model has been shown for the first time in this work. Conclusively, PF14 is an efficient nonviral vector for gene delivery and could be used further in relevant disease models.

## TÄNUSÕNAD

Täna väga enda juhendajaid, professor Ülo Langelit ning Taavi Lehtot väga konstruktiivsete nõuannete ja oskusliku juhendamise eest. Samuti täna professor Margus Poogat ja tema gruppi ning professor Langeli Rootsi laborit koostöö eest. Samuti täna meeldivat kollektiivi molekulaarse biotehnoloogia laborist, eriti Kaido Kurrikoffi asjalike nõuannete ning abi eest *in vivo* katsete teostamisel.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Andaloussi, S. E., Lehto, T., Mäger, I. et al. (2011) Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res*, **39**, 3972-3987.

Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A. and Elsasser, H. P. (2002) Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release*, **82**, 441-454.

Black, D. L. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, **72**, 291-336.

Blume, G. and Cevc, G. (1990) Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta*, **1029**, 91-97.

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7297-7301.

Burton, E. A., Glorioso, J. C. and Fink, D. J. (2003) Gene therapy progress and prospects: Parkinson's disease. *Gene Ther*, **10**, 1721-1727.

Cavazzana-Calvo, M. and Fischer, A. (2007) Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest*, **117**, 1456-1465.

Conner, S. D. and Schmid, S. L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.

Davis, M. E., Chen, Z. G. and Shin, D. M. (2008) Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 771-782.

Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, **269**, 10444-10450.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.

Erbacher, P., Roche, A. C., Monsigny, M. and Midoux, P. (1996) Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res*, **225**, 186-194.

Essa, S., Rabanel, J. M. and Hildgen, P. (2010) Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, **75**, 96-106.

Ezzat, K. (2012) Cell penetrating peptides; chemical modification, mechanism of uptake and formulation development. Stockholm Unniversity, Sweden, Stockholm.

- Ezzat, K., Helmfors, H., Tudoran, O., Juks, C., Lindberg, S., Padari, K., El-Andalousi, S., Pooga, M. and Langel, U. (2012) Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *Faseb Journal*, **26**, 1172-1180.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, **55**, 1189-1193.
- Giacca, M. and Zacchigna, S. (2012) Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release*, **161**, 377-388.
- Glover, D. J., Lipps, H. J. and Jans, D. A. (2005) Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet*, **6**, 299-310.
- Green, M. and Loewenstein, P. M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, **55**, 1179-1188.
- Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T. and Müller, R. H. (2000) 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **18**, 301-313.
- Griesenbach, U., Geddes, D. M. and Alton, E. W. (2004) Gene therapy for cystic fibrosis: an example for lung gene therapy. *Gene Ther*, **11 Suppl 1**, S43-50.
- Halder, J., Kamat, A. A., Landen, C. N. et al. (2006) Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clin Cancer Res*, **12**, 4916-4924.
- Joliot, A. H., Triller, A., Volovitch, M., Pernelle, C. and Prochiantz, A. (1991) alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol*, **3**, 1121-1134.
- Kawabata, K., Takakura, Y. and Hashida, M. (1995) The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res*, **12**, 825-830.
- Kerr, D. (2003) Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 615-622.
- Lappalainen, K., Jääskeläinen, I., Syrjänen, K., Urtti, A. and Syrjänen, S. (1994) Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm Res*, **11**, 1127-1131.
- Lehto, T., Abes, R., Oskolkov, N. et al. (2010) Delivery of nucleic acids with a stearylated (R<sub>x</sub>R)<sub>4</sub> peptide using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release*, **141**, 42-51.
- Lehto, T., Ezzat, K. and Langel, U. (2011a) Peptide nanoparticles for oligonucleotide delivery.

*Prog Mol Biol Transl Sci*, **104**, 397-426.

Lehto, T., Simonson, O. E., Mäger, I. et al. (2011b) A peptide-based vector for efficient gene transfer in vitro and in vivo. *Mol Ther*, **19**, 1457-1467.

Li, S. D. and Huang, L. (2009) Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: role of the supported bilayer. *Biochim Biophys Acta*, **1788**, 2259-2266.

Liou, J. S., Liu, B. R., Martin, A. L., Huang, Y. W., Chiang, H. J. and Lee, H. J. (2012) Protein transduction in human cells is enhanced by cell-penetrating peptides fused with an endosomolytic HA2 sequence. *Peptides*, **37**, 273-284.

Liu, F., Shollenberger, L. M., Conwell, C. C., Yuan, X. and Huang, L. (2007) Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. *J Gene Med*, **9**, 613-619.

Matlin, A. J., Clark, F. and Smith, C. W. (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 386-398.

Medina-Kauwe, L. K., Xie, J. and Hamm-Alvarez, S. (2005) Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther*, **12**, 1734-1751.

Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J. J. and Jaffrès, P. A. (2009) Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol*, **157**, 166-178.

Moret, I., Esteban Peris, J., Guillem, V. M., Benet, M., Revert, F., Dasí, F., Crespo, A. and Aliño, S. F. (2001) Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum. *J Control Release*, **76**, 169-181.

Mulligan, R. C. (1993) The basic science of gene therapy. *Science*, **260**, 926-932.

Mäe, M., El Andaloussi, S., Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H. J., Guterstam, P. and Langel, U. (2009) A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release*, **134**, 221-227.

Nakase, I., Kobayashi, S. and Futaki, S. (2010) Endosome-disruptive peptides for improving cytosolic delivery of bioactive macromolecules. *Biopolymers*, **94**, 763-770.

Owens, D. E. and Peppas, N. A. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, **307**, 93-102.

Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. and Stayton, P. S. (2005) Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 581-593.

Palm, C., Jayamanne, M., Kjellander, M. and Hällbrink, M. (2007) Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake. *Biochim Biophys Acta*, **1768**, 1769-1776.

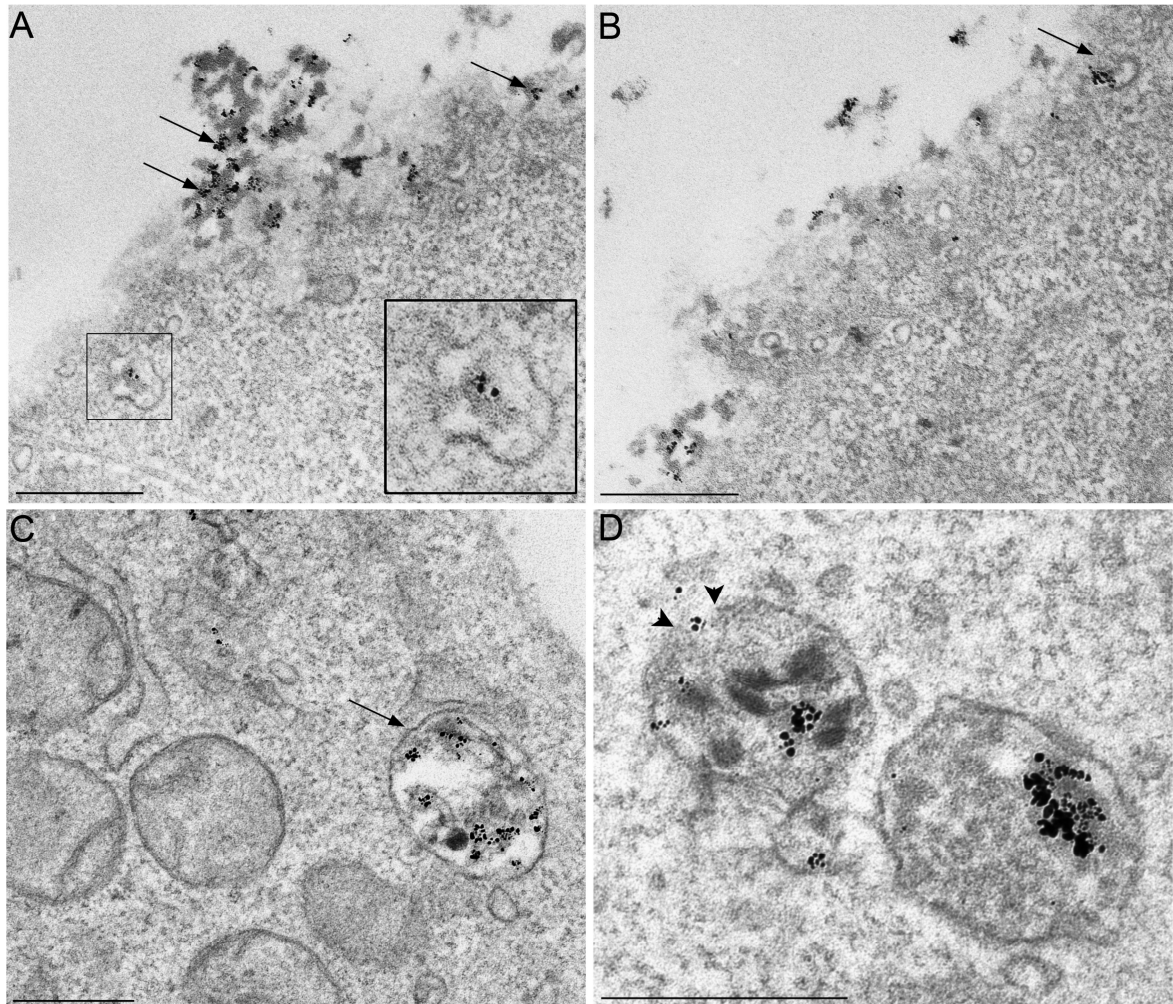
Perche, F. and Torchilin, V. P. (2013) Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *J Drug Deliv*, **2013**, 705265.

Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. and Langel, U. (1998) Cell penetration by transportan. *FASEB J*, **12**, 67-77.

- Portney, N. G. and Ozkan, M. (2006) Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Anal Bioanal Chem*, **384**, 620-630.
- Roser, M., Fischer, D. and Kissel, T. (1998) Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm*, **46**, 255-263.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H. et al. (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, **273**, 352-354.
- Sen, K. and Mandal, M. (2013) Second generation liposomal cancer therapeutics: Transition from laboratory to clinic. *Int J Pharm*, **448**, 28-43.
- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X. et al. (2000) Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta*, **1467**, 165-176.
- Stewart, K. M., Horton, K. L. and Kelley, S. O. (2008) Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem*, **6**, 2242-2255.
- Säälilik, P., Padari, K., Niinep, A., Lorents, A., Hansen, M., Jokitalo, E., Langel, U. and Pooga, M. (2009) Protein delivery with transportans is mediated by caveolae rather than flotillin-dependent pathways. *Bioconjug Chem*, **20**, 877-887.
- Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S. et al. (2005) Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12177-12182.
- Viola, J. R., El-Andaloussi, S., Oprea, I. I. and Smith, C. I. (2010) Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*, **7**, 721-735.
- Wang, W., Li, W., Ma, N. and Steinhoff, G. (2013) Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol*, **14**, 46-60.
- Wattiaux, R., Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S. and Jadot, M. (2000) Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev*, **41**, 201-208.
- Wente, S. R. (2000) Gatekeepers of the nucleus. *Science*, **288**, 1374-1377.
- Whitehead, K. A., Langer, R. and Anderson, D. G. (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*, **8**, 129-138.
- Wirth, T. and Ylä-Herttuala, S. (2013) History of gene therapy. *Gene*.
- Zhu, X. D., Zhuang, Y., Ben, J. J., Qian, L. L., Huang, H. P., Bai, H., Sha, J. H., He, Z. G. and Chen, Q. (2011) Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *J Biol Chem*, **286**, 8231-8239.

# LISAD

## LISA 1



**Joonis 1.** PF14/pDNA nanopartiklite rakku sisenemine ning intratsellulaarne lokaliseerimine. CHO rakke inkubeeriti nanokullaga märgistatud pDNA/PF14 kompleksidega (CR2) 1h, 37 kraadi juures. A – Komplekside interaktsioonid rakumembraaniga (nooled) ning lokaliseerimine kaveolaarsetes struktuurides (kastike). B – PF14/pDNA nanopartiklite lokaliseerimine kaveolaarsetes vesiikulites; C – PF14/pDNA nanopartiklite lokaliseerimine multivesikulaarsetes kehakestes ja D – tsütosoolis, kus noolte otsad näitavad häiritud endosomaalseid membraane.



## PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures

Kadi-Liis Veiman,<sup>†</sup> Imre Mägi,<sup>†</sup> Kariem Ezzat,<sup>‡</sup> Helerin Margus,<sup>§</sup> Tõnis Lehto,<sup>†</sup> Kent Langel,<sup>†</sup> Kaido Kurrikoff,<sup>†</sup> Piret Arukuusk,<sup>†</sup> Julia Suhorutšenko,<sup>†</sup> Kärt Padari,<sup>§</sup> Margus Pooga,<sup>§</sup> Taavi Lehto,<sup>\*,†</sup> and Ülo Langel<sup>†,‡</sup>

<sup>†</sup>Laboratory of Molecular Biotechnology, Institute of Technology, University of Tartu, Nooruse 1, 50411 Tartu, Estonia

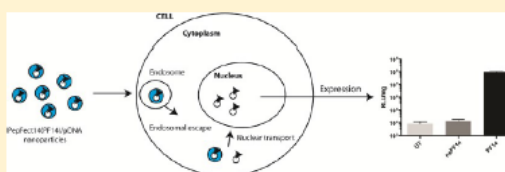
<sup>‡</sup>Department of Neurochemistry, The Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, Stockholm University, SE-10691 Stockholm, Sweden

<sup>§</sup>Department of Developmental Biology, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23, 51010 Tartu, Estonia

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The successful applicability of gene therapy approaches will heavily rely on the development of efficient and safe nonviral gene delivery vectors, for example, cell-penetrating peptides (CPPs). CPPs can condense oligonucleotides and plasmid DNA (pDNA) into nanoparticles, thus allowing the transfection of genetic material into cells. However, despite few promising attempts, CPP-mediated pDNA delivery has been relatively inefficient due to the unfavorable nanoparticle characteristics or the nanoparticle entrapment to endocytic compartments. In many cases, both of these drawbacks could be alleviated by modifying CPPs with a stearic acid residue, as demonstrated in the delivery of both the pDNA and the short oligonucleotides. In this study, PepFect14 (PF14) peptide, previously used for the transport of shorter oligonucleotides, is demonstrated to be suited also for the delivery of pDNA. It is shown that PF14 forms stable nanoparticles with pDNA with a negative surface charge and size of around 130–170 nm. These nanoparticles facilitate efficient gene delivery and expression in a variety of regular adherent cell lines and also in difficult-to-transfect primary cells. Uptake studies indicate that PF14/pDNA nanoparticles are utilizing class A scavenger receptors (SCARA) and caveolae-mediated endocytosis as the main route for cellular internalization. Conclusively, PF14 is an efficient nonviral vector for gene delivery.

**KEYWORDS:** cell-penetrating peptide, nanoparticle, gene delivery, plasmid delivery, nonviral delivery, stearylation



## 1. INTRODUCTION

A fundamental principle of classical gene therapy is to deliver a gene of interest into target cells and tissues to restore the normal physiological expression level of otherwise deficient gene products, thereby correcting the underlying disease phenotype.<sup>1</sup> The easiest way to achieve this is to incorporate the genetic material into a plasmid DNA (pDNA) vector and introduce it to the nucleus of cells. However, pDNA molecules cannot enter cells freely and require assistance in their intracellular delivery due to having a strong negative charge and high molecular weight. This has led to the development of a variety of nonviral pDNA delivery vectors. These vectors are mostly polycationic and are based on different lipids, polymers, or peptides that can neutralize pDNA charge and condense it into nanoparticles.<sup>2,3</sup>

One group of such nonviral vectors that has emerged in the last couple of decades consists of cell-penetrating peptides (CPPs).<sup>4</sup> CPPs are cationic and/or amphipathic peptides that usually do not exceed 30 amino acids in length and have been shown to facilitate the delivery of a wide variety of bioactive cargoes, including pDNA, both in vitro and in vivo (as reviewed in refs 5–9). The cellular uptake mechanism of CPPs has remained elusive, but it is now widely accepted that CPPs, at

least when associated with cargo, usually utilize different endocytic pathways in parallel for internalization.<sup>10,11</sup> Because of this, CPPs and their respective cargo often stay entrapped in the endosomal vesicles, which limits the bioavailability of CPP-based cargo delivery systems,<sup>7</sup> similarly to other nonviral vectors.<sup>3</sup>

Cargo molecules could be vectorized by CPPs via two distinct approaches—by covalent linkage or noncovalent nanoparticle formation—and in most cases, only the latter strategy is applicable for the pDNA. CPP-mediated pDNA delivery has been successful according to many reports,<sup>12,13</sup> but it seems to require certain CPP modifications, as unmodified peptides have generally been relatively poor vectors.<sup>14–18</sup> The reason for this may be related with two generally recognized limitations of CPPs when used for pDNA delivery. First, most CPPs, with or without additional modifications, condense pDNA into weakly associated nanoparticles that disintegrate too easily, probably before delivering a significant amount of

Received: June 27, 2012

Revised: October 24, 2012

Accepted: November 27, 2012

Published: November 27, 2012

pDNA into cells. Second, because CPPs use endocytic pathways to gain access to the cells, most of the CPPs and their respective cargo are destined to stay entrapped in endocytic vesicles. Consequently, cargo molecules will not be available at their site of action (nucleus in case of pDNA). However, these limitations can be overcome when CPPs are chemically modified in certain ways. For example, the addition of a hydrophobic stearic acid residue to some CPPs can have a substantial impact on the bioavailability of CPP/nucleic acid nanoparticles.<sup>19–22</sup>

Our group has lately designed a new series of modified CPPs, PepFects, that have been shown to be efficient for the delivery of different nucleic acids, including pDNA,<sup>22</sup> splice-correcting oligonucleotide (SCOs),<sup>23,24</sup> and siRNAs,<sup>25</sup> both *in vitro* and *in vivo*. In this work, we sought to study whether PepFect14 (PF14) peptide, having previously been shown to be an efficient delivery vehicle for SCOs,<sup>24</sup> could be used for the delivery of pDNA.

We here report that PF14 can condense pDNA into negatively charged bioactive nanoparticles that deliver their cargo genes into different adherent cell lines and primary cells more efficiently than its predecessor stearyl-transportan 10 (TP10) [PepFect3 (PF3)] peptide. There is strong evidence that the uptake of PF14/pDNA nanoparticles involves class A scavenger receptors (SCARA) and caveolae-mediated endocytosis. Also, the high activity of PF14 seems to be attributed to its ability to induce the destabilization of endosomal membranes.

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

**2.1. Synthesis of Peptides.** PF14 (stearyl-AGYLLGKLL-OOLAAALLOOLL-NH<sub>2</sub>) and unmodified PF14 (nsPF14, AGYLLGKLL-OOLAAALLOOLL-NH<sub>2</sub>) were synthesized in a stepwise manner in a 0.1 mmol scale on an automated peptide synthesizer (Applied Biosystems, ABI433A) using a Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyl) solid-phase peptide synthesis strategy with Rink-amide MBHA (methylbenzylhydramine) resin (Fluka) as a solid phase to obtain C terminally amidated peptides. N-terminally stearylated peptides were prepared by treatment of peptidyl resins with 4 equiv of stearic acid (Sigma), 4 equiv of HOBt/HBTU (MultiSynTech, Germany), and 8 equiv of DIEA (Fluka) in DMF for 60 min. The final cleavage was performed using a standard protocol [95% trifluoroacetic acid (TFA)/2.5% TIS/2.5% water] for 2 h at room temperature. Peptides were purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) using a C18 column and 5–80% acetonitrile (0.1% TFA) gradient. The molecular weight of the peptides was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectroscopy, and purity was >90% as determined by analytical HPLC.

**2.2. Cell Cultures.** Chinese hamster ovary (CHO) cells were grown at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM-F12) with glutamax supplement with 0.1 mM nonessential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Germany). HEK293, U87, U2OS, and MEF cells were grown at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in DMEM with glutamax supplemented with 0.1 mM nonessential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (PAA Laboratories GmbH). mES cells were grown in DMEM high glucose (4.5 g/L) with L-glutamine, 0.1 mM NNEA, 1.0 mM

sodium pyruvate, 15% ES-cell tested FBS, antibiotics, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, and 1000 U/mL leukemia inhibitory factor, using mitomycin C inactivated mouse embryonic fibroblasts as a feeder monolayer. THP-1, human acute monocytic leukemia cells (CLS, Germany), were grown at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium with glutamax supplement, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin (PAA Laboratories GmbH).

**2.3. Nanoparticle Formation.** A 0.5 µg amount of pGL3 or pEGFP-C1 plasmid (4.7 kb), expressing luciferase or enhanced green fluorescent protein (EGFP), respectively, was mixed with CPPs at different peptide-to-pDNA charge ratios of 0.5:1–4:1 (CR0.5–CR4) in MQ water in 50 µL (1/10th of the final volume). CRs were calculated taking into account the positive charges of the peptide and negative charges of the pDNA. For instance, the final concentration of PF14 was 0.64 µM at CR1. Complexes were formed for 1 h at room temperature. Meanwhile, the cell medium was replaced in 24-well tissue culture plates for fresh media (450 µL). In the case of Lipofectamine 2000 (LF2000) (Invitrogen, Sweden), the complexes were formed according to the manufacturer's protocol, using the recommended amounts for each cell line. PF3 was utilized as described elsewhere.<sup>22</sup>

DNA condensation was analyzed using a gel retardation assay and ethidium bromide (EtBr) (Sigma, Sweden) exclusion assay. Briefly, for both assays, complexes were formed as described above. In the case of the gel retardation assay, samples were electrophoresed on agarose gel (1%) in TAE (1X) and imaged by staining the gel with EtBr (0.5 µg/mL). In the EtBr exclusion assay, after 1 h of incubation, 135 µL of MQ water was added to each sample and transferred into a black 96-well plate (NUNC, Sweden). Thereafter, 15 µL of EtBr solution was added to give a final EtBr concentration of 400 nM. After 10 min, the fluorescence was measured on a Spectra Max Gemini XS fluorometer (Molecular Devices, Palo Alto, CA) at  $\lambda_{ex}$  = 518 nm and  $\lambda_{em}$  = 605 nm. Results are given as relative fluorescence, and a value of 100% is attributed to the fluorescence of naked DNA with EtBr.

**2.4. Heparin Displacement Assay.** For the analysis of their resistance to heparin, peptide formulations containing 100 ng of pDNA were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of heparin (sodium salt, Sigma-Aldrich, Germany) over a range of concentrations. After the incubation period, loading buffer was added, and the samples were analyzed on agarose gel as described above. We also used spectrofluorometry to corroborate these findings. In brief, complexes were formed as described above. After 1 h of incubation, heparin sodium was added to the complexes over a range of concentrations and incubated for an additional 30 min at 37 °C. Then, EtBr was added, and the measurements were carried out as described above. Results are given as relative fluorescence, and a value of 100% is attributed to the fluorescence of naked DNA with EtBr.

**2.5. Dynamic Light Scattering (DLS) and  $\zeta$ -Potential Measurements.** The hydrodynamic mean diameter of the DNA nanoparticles was determined by DLS studies using a Zetasizer Nano ZS apparatus (Malvern Instruments, United Kingdom). pDNA complexes resulting from the addition of PF14 peptide were formulated according to the protocol for *in vitro* transfection, as described above, and assessed in disposable low volume cuvettes. Briefly, pDNA complexes were formulated in MQ water, in 100 µL volume, at a final



concentration of 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of pDNA. After 30 min of incubation at room temperature, the DNA complexes were diluted in MQ, Opti-MEM (or supplemented with FBS), or 0.9% NaCl solution into a final volume of 500  $\mu\text{L}$ . All data were converted to "relative intensity" plots from where the mean hydrodynamic diameter was derived. Different conditions were used to measure  $\zeta$ -potential. Briefly, pDNA complexes were formulated in MQ water, in 300  $\mu\text{L}$  volume, at a final concentration of 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of pDNA. After 30 min of incubation at room temperature, the DNA complexes were diluted in MQ, Opti-MEM (or supplemented with FBS), or 0.9% NaCl solution into a final volume of 1 mL. Measurements were performed in ZS Malvern instrument, set to Automode and a number of five runs.

**2.6. Plasmid Delivery Assay.** Five  $\times 10^4$  CHO, HEK293, U87, U2OS, RD4, and mES and  $3 \times 10^4$  MEF cells were seeded 24 h before the experiment into 24-well plates. Cells were treated with CPP/pDNA complexes at different CRs for 4 h in serum-free or serum-containing media followed by the addition of 1 mL of 10% serum-containing medium and incubated for another 20 h. Thereafter, cells were washed and lysed using 100  $\mu\text{L}$  of 0.1% Triton X-100 in PBS buffer for 30 min at room temperature. The luciferase activity was measured using Promega's luciferase assay system on GLOMAX 96 microplate luminometer (Promega, Sweden) and normalized to protein content (Lowry, BioRad, United States). LF2000 (Invitrogen, Sweden) was used according to the manufacturer's protocol, whereas transfections were carried out in 10% FBS-containing media.

In decay experiments, transfections in CHO cells with luciferase-encoding pDNA were carried out as described above. However, cells were incubated over a various range of time—4, 8, 24, 48, and 72 h—and analyzed as described above. In the studies assessing the confluency dependency, cells were seeded 24 h prior to the transfections at different amounts ( $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ , and  $10 \times 10^4$ ), and experiments were carried out and analyzed as described above.

In SCARA inhibition experiments,  $5 \times 10^4$  CHO cells were seeded 24 h before the experiment into 24-well plates. The pGL3 plasmid was mixed with PF14 at CR2, and complexes were incubated for 1 h at room temperature. Before treatment, the cell medium was replaced with fresh serum free or 10% serum-containing medium with different inhibitory ligands or controls (450  $\mu\text{L}$ ). Then, cells were incubated for 1 h before the addition of the nanocomplexes and then incubated for an additional 24 h. Thereafter, the luciferase activity measurements were carried out as described above. The final concentrations for different inhibitory ligands and controls were used as described elsewhere.<sup>26</sup> Briefly, polyinosinic acid (poly I) and polycytidylic acid (poly C) were used at the final concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , while fucoidan, galactose, dextran sulfate, and chondroitin sulfate were used at 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**2.7. Spectrofluorometry Analysis.** Five  $\times 10^4$  CHO cells were seeded in 24-well plates 24 h prior to cellular treatments with fluorescein-labeled plasmid (Mirus, Germany) complexed with nsPF14 or PF14 as described in the complex formation section. Cells were treated for 24 h either in serum-free DMEM or in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were washed twice with PBS and once, briefly, with trypsin to remove membrane-bound complexes. Cells were thereafter lysed using 0.1% Triton in PBS for 1 h, and lysates were transferred to a black 96-well plate. The fluorescence was measured on at 490/518 nm on a Spectra Max Gemini (Molecular Devices, United

States) spectrofluorometer. The fluorescence signal (relative fluorescence unit, RFU) from untreated cells was subtracted from the signals of treated cells.

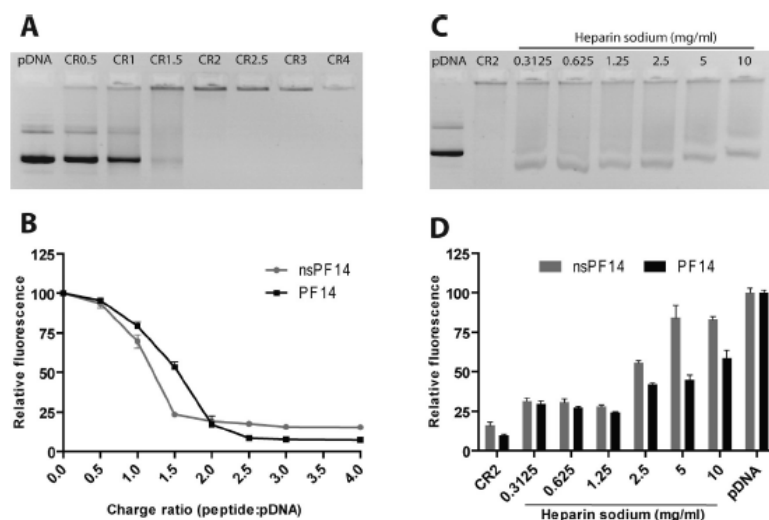
**2.8. Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) Analysis.** CHO cells were seeded 24 h prior to experiments into 24-well plates. Cells were treated with peptides and pEGFP plasmid complexes at CR2 and CR3 and incubated for 4 h in serum-containing or serum-free medium, followed by the addition of 1 mL of 10% serum-containing medium and incubated for another 20 h. Thereafter, cells were washed twice with PBS and detached from the plate by 100  $\mu\text{L}$  of 0.25% trypsin-EDTA (Invitrogen, Sweden) for 5 min at 37 °C. Cells were suspended in ice cold PBS containing 2% FBS and held on ice. The percentage of transfected cells was determined by counting the cells displaying EGFP fluorescent signal. FACS analysis was carried out with BD LSRII Flow cytometry (BD Biosciences) and software FACSDiva (BD Biosciences, Germany).

**2.9. IL-1 $\beta$  Analysis.** THP1 cells were differentiated using phorbol myristate acetate (PMA) (10 ng/mL) for 48 h and subsequently seeded into 24-well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well). Cells were treated as specified above. Lipopolysaccharide (LPS) (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as a positive control. Culture supernatants were collected at 24 and 48 h after treatment and assayed for IL-1 $\beta$  by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's protocol (R&D systems).

**2.10. MTS Proliferation Assay.** Cell proliferation was studied with MTS proliferation assay (Promega, Sweden). The MTS assay is based on the activity of mitochondrial dehydrogenases to convert tetrazolium salts into formazan, which absorbs light at 450 nm. Briefly,  $1 \times 10^4$  cells were seeded 1 day before treatment into a 96-well plate (Greiner Bio One, Germany). Cells were treated with CPP/pDNA nanoparticles at different CRs as described above, however, with optimizing the amounts to fit with 96-well format. Thereafter, the MTS proliferation assay was used according to the manufacturer's protocol. The absorbance was measured on Tecan Sunrise microplate reader (Tecan Trading AG, Switzerland). Untreated cells were defined as 100% viable.

**2.11. Statistics.** Values in all experiments are represented as means  $\pm$  standard errors of the mean (SEMs) of at least three independent experiments done in duplicate. An increase in delivery efficiency was considered significant at \*\*\* $p < 0.001$  using analysis of variance (ANOVA) Dunnett's multiple comparison test or ANOVA Bonferroni's multiple comparison test.

**2.12. Labeling of pDNA for Electron Microscopy.** To visualize pDNA in cells by transmission electron microscopy, pGL3 plasmid was tagged with biotin and complexed with streptavidin-nanogold (SA-NG) conjugate (Nanoprobes, USA, d 1.4 nm). Biotin was covalently coupled to pDNA by using a Nucleic Acid Labeling Kit according to the manufacturer's protocol (Label IT Nucleic Acid Labeling Kit, Biotin, Mirus Bio, United States). Briefly, the biotin reagent dissolved in Reconstitution Solution was mixed with pDNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) at a ratio 1:5 (v:v) in labeling buffer A for 1 h at 37 °C. The labeled plasmid was separated from free biotin by ethanol precipitation and dissolved in MQ water. Biotinylated pDNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) was first complexed with SA-NG conjugates (0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 30 min at 37 °C followed by complexing with PF14 at CR2 in MQ water in 100  $\mu\text{L}$  (1/10th of the final treatment volume) for 30



**Figure 1.** Physicochemical characterization of the PF14/pDNA nanoparticles. (A) Ability of PF14 to form complexes with pDNA at different peptide-to-pDNA CRs (CR0.5–CR4) was evaluated by gel retardation assay. (B) Comparison of the pDNA condensation efficiency of PF14 and nsPF14 (lacking the stearic acid modification) with ethidium bromide (EtBr) exclusion assay. (C) Evaluation of the stability and the dissociation profile of the PF14/pDNA nanoparticles (formed at CR2) upon treatment with heparin sodium (heparin) at different concentrations, ranging from 0.3125 to 10 mg/mL, analyzed by gel retardation assay. (D) Heparin treatments of PF14/pDNA and nsPF14/pDNA nanoparticles analyzed by spectrofluorometry.

min at RT. Each pDNA molecule in average had associated 3–5 nanogold particles.

**2.13. Treatment of Cells for Electron Microscopy.** CHO cells were seeded onto glass coverslips in 24-well plates, grown to 80–90% confluency, and incubated with full culture medium containing pDNA–SA–NG complexes with PF14 for 1–4 h at 37 °C. After incubation, the cells were washed, fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h at RT, processed for electron microscopy, and analyzed as described earlier.<sup>27</sup> Briefly, the nanogold label was magnified by silver enhancement with HQ Silver kit from Nanoprobes (Yaphank, NY), and the silver deposition was stabilized with gold chloride. The cells were postfixed with osmium tetroxide and dehydrated with ethanol. The specimens were embedded in epoxy resin (TAAB Laboratories Equipment Ltd, United Kingdom), cut into ultrathin sections, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The sections were examined with JEM-100S (JEOL, Tokyo, Japan) transmission electron microscope, and microphotos were analyzed and processed with Adobe Photoshop CS4 software.

### 3. RESULTS

**3.1. Characterization of PF14/pDNA Nanoparticles.** The ability of CPPs to vectorize pDNA by noncovalent nanoparticle formation strategy has been reported many times.<sup>28–30</sup> This strategy is based on the phenomenon that cationic and/or amphipathic CPPs can condense negatively charged nucleic acids, including pDNA, into nanosized complexes/nanoparticles, mediated by electrostatic- and/or hydrophobic interactions.<sup>31</sup>

To assess the nanoparticle formation efficiency, PF14 was mixed with pDNA at different peptide-to-pDNA CRs and analyzed by a simple gel retardation assay. pDNA was completely incorporated into the nanoparticles at CR2 as

pDNA could not migrate into the gel at higher CRs (Figure 1A). These results were corroborated in an ethidium bromide (EtBr) quenching assay, which showed that fluorescence quenching reached a plateau at CR2, suggesting the absence of free pDNA fraction at higher CRs (Figure 1B). In comparison, nsPF14, a peptide that lacks stearic acid modification, also condensed pDNA with similar efficiency in both of these assays (Figure 1B and data not shown).

To become biologically active, peptide/pDNA nanoparticles should form stable enough nanoparticles, and at the same time, the pDNA must be at least partially released from the complexes once delivered into cells. To have an insight into these characteristics in the case of PF14/pDNA and nsPF14/pDNA complexes, we formed the nanoparticles at CR2, incubated them with varying amounts of a negatively charged competitor molecule heparin sodium (heparin), and analyzed the particle-dissociating properties of heparin by agarose gel electrophoresis. Heparin was able to partially displace pDNA from PF14 nanoparticles, indicated by the observed free pDNA fraction (Figure 1C). This was confirmed by analyzing the liberated pDNA amounts spectrofluorometrically. According to the latter assay, 50% of the pDNA was released from PF14/pDNA complexes at a heparin concentration of 10 mg/mL (Figure 1D). However, a substantially lower concentration of heparin was needed to dissociate the nsPF14/pDNA nanoparticles, indicating that nanoparticles formed with nsPF14 are less stable than PF14 complexes (Figure 1D).

After confirming effective nanoparticle formation, it was sought to analyze their physicochemical properties by DLS. DLS studies revealed that the hydrodynamic diameter of PF14/pDNA nanoparticles was in the range of 130–170 nm (Table 1) at different CRs in MQ water. To estimate the impact of the biological fluids to these particles, measurements were also carried in the presence of serum-free or serum-supplemented



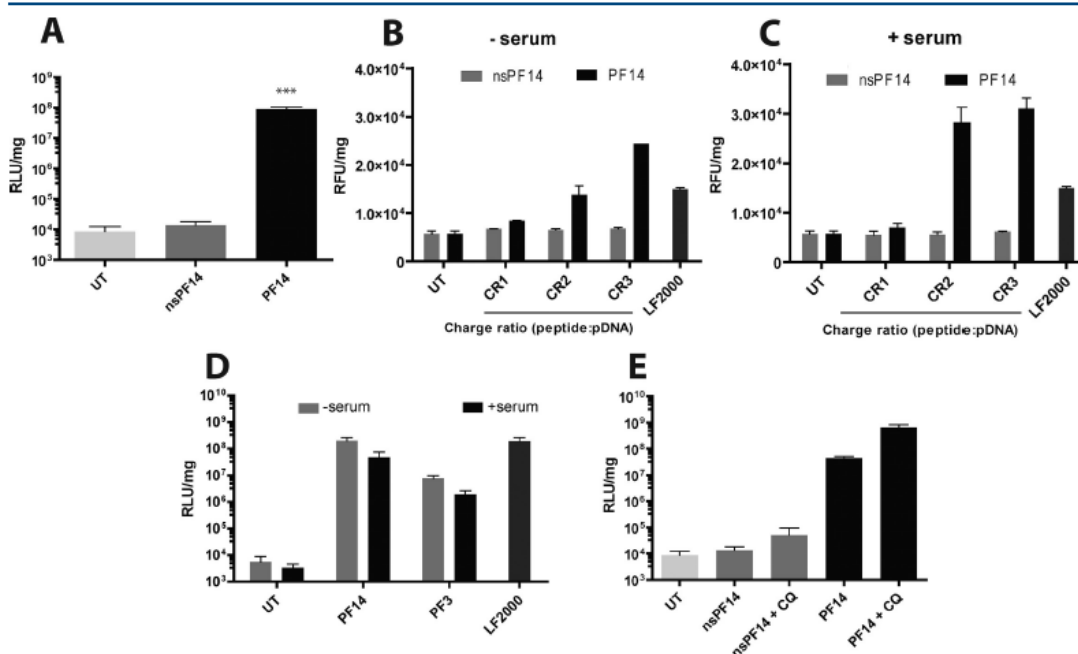
**Table 1.** Physicochemical Properties of PF14/pDNA Nanoparticles as Measured by DLS

CR (PF14:pDNA)	average size (nm $\pm$ SD)	$\zeta$ -potential (mV $\pm$ SD)
1:1	166 $\pm$ 24	-40 $\pm$ 3
1.5:1	148 $\pm$ 14	-42 $\pm$ 1
2:1	134 $\pm$ 6	-39 $\pm$ 4
3:1	148 $\pm$ 31	-24 $\pm$ 3
2:1 + Opti-MeM	209 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 2
2:1 + Opti-MeM + FBS	220 $\pm$ 69	-26 $\pm$ 2
2:1 + NaCl	418 $\pm$ 184	-31 $\pm$ 2

Opti-MeM (Opti-MeM + FBS) transfection media. The addition of Opti-MeM and Opti-MeM + FBS increased the particle size roughly two times at CR2 (Table 1). PF14/pDNA nanoparticles had pronounced negative  $\zeta$ -potential, around -40 mV when diluted with MQ water. Changing the surrounding media to Opti-MeM or Opti-MeM + FBS changed the  $\zeta$ -potential to more neutral; however, the overall charge remained in the negative range. Also, when the NaCl solution was added to the PF14/pDNA nanoparticles, they

aggregated, and their hydrodynamic diameter increased (Table 1).

**3.2. Intracellular Delivery and Uptake Mechanism of PF14/pDNA Nanoparticles.** Next, we evaluated if PF14/pDNA nanoparticles are bioactive. For this, we used complexes of PF14 and luciferase-encoding plasmid (pGL3) to transfect CHO cells. After 24 h of incubation, the luciferase activity was increased by about 4 orders of magnitude (Figure 2A). Interestingly, the nonstearylated nsPF14/pDNA nanoparticles were ineffective when tested in parallel (Figure 2A). Next, we studied if this difference in gene delivery efficiency could be due to the differences in the uptake of PF14 and nsPF14 particles. For this, we used fluorescently-labeled pDNA to formulate nanoparticles and quantified their overall cellular uptake. This analysis showed that PF14/pDNA nanoparticles were taken up dose dependently, in both the absence (Figure 2B) and the presence (Figure 2C) of serum proteins. At the same time, the intracellular fluorescence of nsPF14/pDNA nanoparticles remained almost in line with background levels, indicating that these particles were mostly not taken up by these cells, neither in the absence (Figure 2B) or in the presence (Figure 2C) of serum proteins.



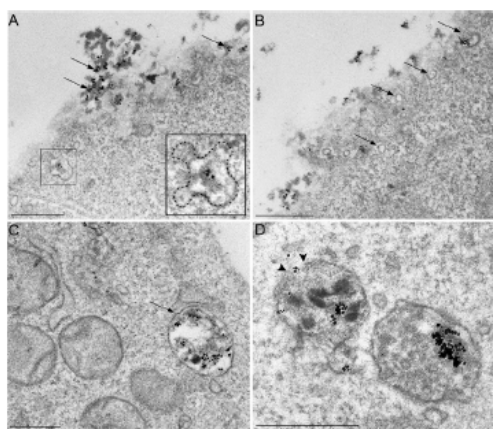
**Figure 2.** Biological activity of the PF14/pDNA nanoparticles. (A) PF14-mediated pDNA delivery in CHO cells in comparison with the nsPF14 peptide. Briefly,  $4 \times 10^4$  CHO cells were seeded 24 h prior to experiment in 24-well plates. Cells were treated with complexes formed at different CRs, ranging from CR1 to CR4 (in this case CR2 is shown), using 0.5  $\mu$ g of pDNA per well, for 4 h in serum-free and serum-containing media followed by replacement to 10% serum-containing medium and incubated additionally for 20 h. Cells were washed with HKR buffer and lysed in 0.1% Triton X-100, and the luciferase activity was measured and normalized against the protein content in each well. The uptake of fluorophore-labeled pDNA in complex with nsPF14 and PF14 (B) in the absence of a serum proteins and (C) in the presence of a serum proteins was also carried out in CHO cells at different peptide-to-pDNA CRs. Treatments were carried out as described above; however, cells were lysed for 1 h, and fluorescence was measured in a black 96-well plate at 490/518 nm on a spectrofluorometer. (D) Transfection comparison of stearyl-TP10 (PF3) and PF14 at CR2 in serum-free and serum-containing media, carried out as described above. (E) Effect of endosomotropic agent chloroquine (CQ) on the transfection with PF14/pDNA and nsPF14/pDNA nanoparticles. Studies were carried out described above; however, CQ at the final concentration of 100  $\mu$ M was added to the transfection media simultaneously with the nanoparticles (formed at CR2). LF2000 was used according to the manufacturer's protocol. (A) \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA Bonferroni's multiple comparison test.

We also compared gene delivery efficiency of PF14 and its predecessor peptide PF3 (that has been successfully used for gene delivery earlier<sup>22</sup>) by transfecting CHO cells with peptide/pDNA nanoparticles formed at CR2. PF14 was found to be around 20–30-fold more efficient than PF3, and these effects were similar between the serum-free and the serum-containing transfection conditions (Figure 2D).

As mentioned above, delivery vectors that enter cells via endocytosis can remain entrapped in endosomal vesicles without releasing their cargo to appropriate cellular compartments. To test if this is a case also for PF14/pDNA nanoparticles, we transfected CHO cells with these complexes in the presence of a well-known endosomolytic agent chloroquine. In the case of PF14, chloroquine was able to enhance the delivery efficiency by another 10-fold (Figure 2E), indicating that PF14/pDNA nanoparticles were taken up by endocytic pathways and that these particles were sequestered in the endosomal vesicles to some extent. However, chloroquine also enhanced the transfection efficiency of nsPF14/pDNA nanoparticles by five times, showing that a small amount of these particles was taken up by the cells and resided in the endosomal compartments (Figure 2E).

Next, we visualized cell membrane association and intracellular trafficking of PF14/pDNA nanoparticles by transmission electron microscopy (TEM). For better visualization, the pGL3 plasmid was first tagged with about three SA-NG molecules and then used for nanoparticle formation.

PF14/pDNA associated with the plasma membrane as small clusters. These clusters contained usually 2–10 nanogold labels, indicating that each peptide-plasmid nanoparticle contained 1–2 pDNA molecules. Mostly, these complexes bound to cells as single nanoparticles, which occasionally interacted with each other forming chainlike structures (Figure 3A, arrows).



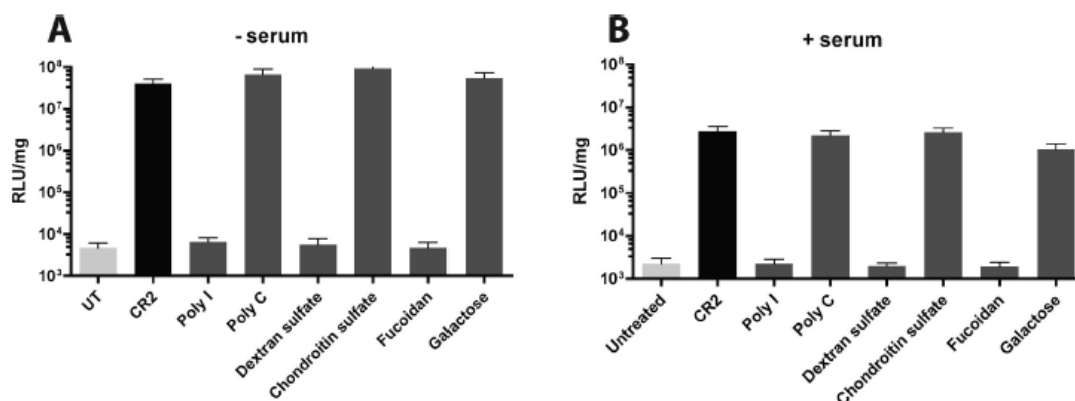
**Figure 3.** Internalization and intracellular localization of pDNA–PF14 complexes. CHO cells were incubated with the Nanogold-labeled pDNA–PF14 complexes (black dots represent the label on complexes) for 1 h at 37 °C and processed for transmission electron microscopy analysis. (A) The interactions of complexes (pointed by arrows) with cells and localization in caveolar structure (inset). The localization of pDNA–PF14 nanocomplexes in forming caveolar vesicle (B), multivesicular body (pointed by arrows in C and D), and cytosol (D). Arrowheads in D show disrupted endosomal membrane. Scale bars, 500 nm.

Consistent with the earlier observation that PF14/pDNA nanocomplexes are taken up via endocytosis, these nanoparticles were first detected in endocytic vesicles close to the plasma membrane (Figure 3A, inset). These vesicles were mostly of caveolar origin as judged by their size and morphology (Figure 3B, arrows). The caveolae were well recognizable as round or flask-shaped plasma membrane invaginations of 50–100 nm in diameter, lacking a dense cytoplasmic coat and being clearly distinguishable from clathrin-coated structures. Inside cells, the caveolar vesicles were also organized to caveosomes, the grapelike groups or rosettes (inset in Figure 3A).<sup>32</sup> Later, within 1 h of incubation, the particles were targeted to multivesicular bodies (Figure 3C,D), where the disruption of some endosomal membranes was clearly detectable, paving the way for the PF14/pDNA nanoparticles to escape to cytosol (Figure 3D, arrowheads). The nanocomplexes accumulated in perinuclear vesicles but were not detected in the nucleus after 1–2 h, suggesting the translocation into nucleus to be a slow or rare process. However, after 4 h, pDNA–PF14 complexes had reached the nucleus of few cells, whereas no marked difference was observed in the cellular uptake or intracellular localization pattern of complexes, except the amount of plasmid outside endosomes had risen.

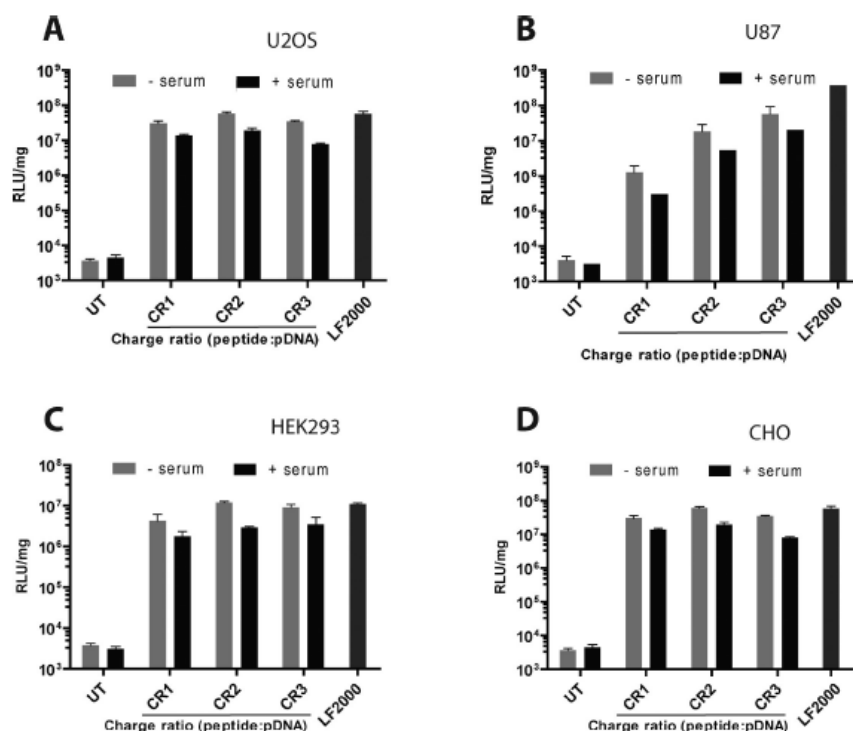
Our group has recently shown that PF14-mediated delivery of short oligonucleotides (ONs) is facilitated by the SCARAs,<sup>26</sup> which are known to be associated with the uptake of negatively charged molecules.<sup>33,34</sup> Moreover, it has been shown that SCARAs are internalized by caveolae-mediated endocytosis.<sup>35</sup> To evaluate if SCARAs are also involved in the uptake of PF14/pDNA nanoparticles, we pretreated CHO cells with different SCARAs inhibitors, carried out the transfections, and measured the luciferase activity 24 h later. SCARA inhibition induced almost complete knockdown of luciferase activity (Figure 4A), indicating that uptake of PF14/pDNA nanoparticle was probably blocked almost completely. At the same time, control ligands did not affect the delivery efficiency and subsequent gene expression of PF14/pDNA nanoparticles (Figure 4B). These results indicate that SCARAs and caveolae-mediated endocytosis are associated and largely responsible for the uptake of PF14/pDNA nanoparticles.

To further corroborate that complete inhibition of the biological activity of the PF14/pDNA nanoparticles would be due to the specific inhibition of SCARA and not for the ability of the used ligands to destabilize the nanoparticles, PF14/pDNA nanoparticles were treated with SCARA ligands and analyzed by agarose gel electrophoresis. As seen in Figure S1A in the Supporting Information, SCARA ligands did not affect the stability of the particles. Also, it was confirmed that the SCARA ligands did not have any intrinsic capacity to form nanocomplexes with pDNA (Figure S1B in the Supporting Information).

**3.3. Transfection Efficiency of PF14/pDNA Nanoparticles in Different Cell Lines and the Presence of Serum Proteins.** After establishing that PF14 can successfully deliver pDNA into CHO cells and induce significant gene expression, we aimed to reproduce these effects in a variety of other cell lines. We transfected U2OS (Figure 5A), U87 (Figure 5B), and HEK293 (Figure 5C) cells with PF14/pDNA particles and observed a significant increase in gene expression up to more than 4 logs in all of these cell lines (Figure 5). While a significant increase in gene expression was achieved at different peptide-to-pDNA CRs, CR2 seemed to be optimal,



**Figure 4.** Impact of the SCARA inhibitors on the delivery of PF14/pDNA nanoparticles. Five  $\times 10^4$  CHO cells were seeded 24 h prior to experiments into 24-well plates. One hour prior to the experiment, cell media were changed to fresh serum-free or serum-containing media, and cells were incubated with SCARA inhibitory ligands and their controls. The final concentrations of inhibitory ligands were as follows: polyinosinic acid (poly I) and polycytidylic acid (poly C) was used at 10  $\mu$ g/mL, and fucoidin, galactose, dextran sulfate, and chondroitin sulfate were used at 5  $\mu$ g/mL. Thereafter, cells were treated with PF14/pDNA nanoparticles (formed at CR2) in the absence (A) or (B) presence of serum proteins and analyzed 24 h later for luciferase expression as in Figure 2A.



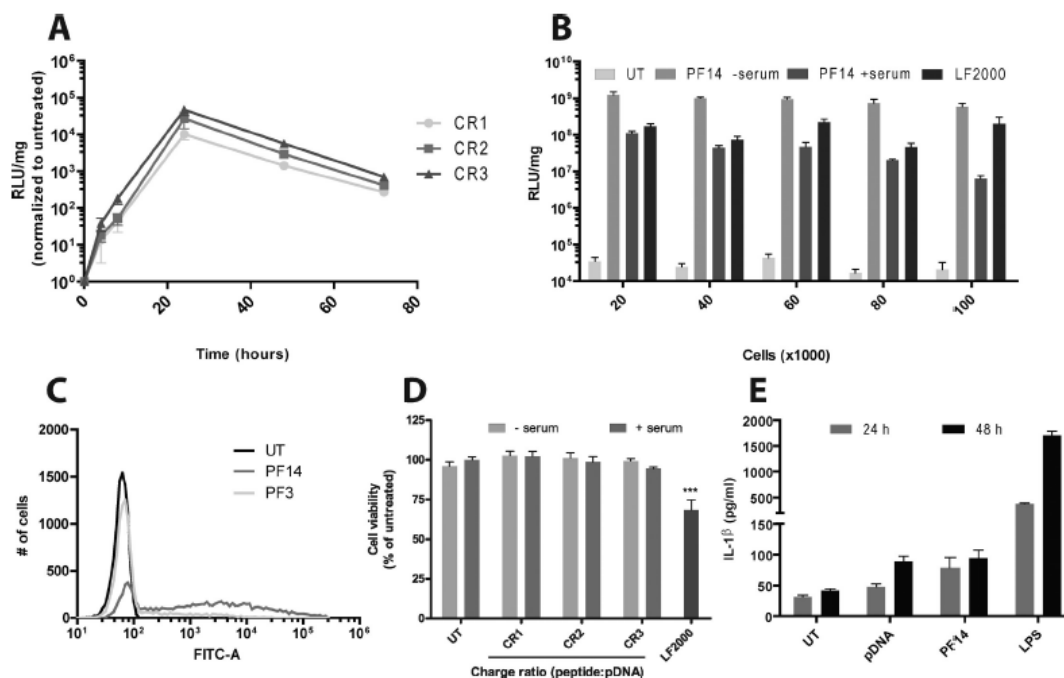
**Figure 5.** Delivery efficacy of PF14/pDNA nanoparticles in different cell lines and effect of the presence of serum proteins on transfections. (A)  $5 \times 10^4$  U2OS, (B)  $5 \times 10^4$  U87, (C)  $5 \times 10^4$  HEK293, and (D)  $5 \times 10^4$  CHO cells were seeded 24 h before experiment into 24-well plates. Cells were treated and analyzed as in Figure 2A. LF2000 was used according to the manufacturer's protocol.

and in many cases, delivery efficiency decreased when the peptide concentration was raised above this threshold. In line with the results in Figure 2, PF14 delivery efficiency in all of these cell lines was only moderately affected by the presence of serum (Figure 5).

**3.4. Gene Expression Kinetics Induced by PF14/pDNA Nanoparticles.** To understand the pharmacodynamics of PF14/pDNA nanoparticles, it is crucial to know the decay

kinetics of nanoparticle-induced gene expression. Therefore, we transfected CHO cells with these nanoparticles and measured luciferase expression at 4, 8, 24, 48, and 72 h. Already after 4 h, the luciferase activity had increased over a 10-fold, as compared to control levels, and increased in time until reaching the maximal activity at 24 h (Figure 6A). Thereafter, the luciferase activity started to decline, decreasing 5-fold at 48 h as compared to 24 h and another 5-fold after 72 h. Also, these trends were





**Figure 6.** Evaluation of decay kinetics, confluence dependency, delivery efficiency in cell populations, toxicity profile, and induction of innate immunity mediated by PF14/pDNA nanoparticles. (B) To assess the kinetics of gene expression induced by PF14/pDNA nanoparticles, CHO cells were transfected as in Figure 2A; however, cells were harvested at different time points between 4 and 72 h. (B) To assess the impact of increasing cell confluency on the transfection efficiency,  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ , and  $1 \times 10^5$  CHO cells were seeded 24 h prior to experiment into 24-well plates. Cells were treated and analyzed as in Figure 2A. (C) To evaluate the delivery efficiency in cell population, PF14, and its parent PF3 peptide, nanoparticles with pDNA encoding for EGFP were transfected into CHO cells (formed at CR2) in serum-free conditions (treated as in Figure 2A). Twenty-four hours later, EGFP expression in cell population was evaluated by FACS analysis. (D) Toxicity was assessed by MTS proliferation assay 24 h after treatment of cells with PF14/plasmid nanoparticles at different CRs (CR1–CR3) or lipofection. The values represent the mean of at least three independent experiments performed in duplicate (means  $\pm$  SEMs). (E) Analysis of IL-1 $\beta$  induction in primed THP1 cells treated with PF14/plasmid nanoparticles. LPS was used as a positive control. Supernatants were analyzed by ELISA assay 24 and 48 h after incubation. (D) \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA Bonferroni's multiple comparison test.

very similar if the transfections were carried out either in the absence (Figure 6A) or in the presence of serum components in the transfection media (data now shown).

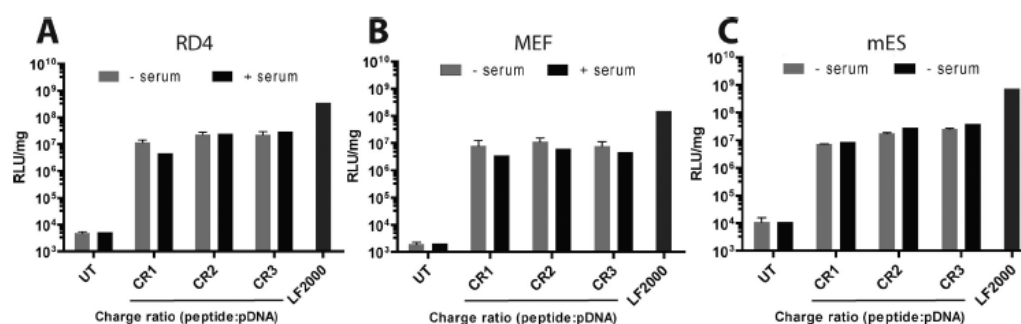
**3.5. Confluence Dependency and the Transfections in the Cell Populations.** Cell confluence can affect delivery efficacy of nonviral transport vectors, which could be important both for in vitro and in vivo gene delivery. Consequently, one requirement for a nonviral delivery vector is that it should perform reasonably well at different cell densities. To evaluate this, CHO cells were seeded in a 24-well plates at different cell numbers ranging from  $2 \times 10^4$  to  $1 \times 10^5$  cells per well, and transfections were carried out as described above. As seen in Figure 6B, cell confluence levels did not have a significant impact on the transfection efficiency of these nanoparticles in serum-free media as luciferase expression levels remained almost the same at different confluence levels (similar effects were seen in case of LF2000).

Another important aspect of the delivery efficiency is to assign if transfections induce gene expression uniformly within the whole cell population. We evaluated this by transfecting CHO cells with PF14/EGFP encoding pDNA particles and analyzed the EGFP expression by flow cytometry. These

experiments revealed that in serum-free transfection conditions, PF14/pDNA nanoparticles were able to increase EGFP expression in the majority of cells (Figure 6C). We also compared PF14 with its predecessor PF3 vector. As compared to PF3, PF14 was much more efficient in transfecting a larger cell population, and also, the level of expression was higher, well in line with results seen in the luciferase assay described above (Figure 2D). When the transfections with PF14 were carried out in the presence of serum proteins, a much smaller cell fraction was expressing EGFP (Figure S2 in the Supporting Information).

**3.6. Toxicological and Immunological Profile of PF14-Mediated Transfections.** The in vitro toxicity of many gene delivery vehicles has prohibited their utilization in vivo. First indications of toxicity are usually measured by using different cell viability assays, for example, MTS assay. To assign this, we carried out transfections with PF14/pDNA nanoparticles and measured its impact on the cell viability by using MTS assay. According to this, PF14 did not affect cell viability either in the presence or in the absence of serum; therefore, PF14 could be considered nontoxic to the cells at these conditions (Figure 6D).





**Figure 7.** PF14-mediated pDNA delivery into difficult-to-transfect and primary cells. (A)  $5 \times 10^4$  RD4, (B)  $3 \times 10^4$  MEF, and (C)  $5 \times 10^4$  mES cells were seeded 24 h before the transfections. Cells were transfected with PF14/pDNA nanoparticles and analyzed for gene expression as described in Figure 2A.

Another important aspect in the toxicity profile of the delivery vehicle is that transfections should not induce immunogenic side effects. To test whether PF14/pDNA nanoparticles induce innate immunity, we carried out the experiments in immunocompetent differentiated THP1 cells and measured the IL-1 $\beta$  secretion from these cells by ELISA assay. These measurements revealed that PF14/pDNA nanoparticles, in these conditions, did not induce cytokine release (Figure 6E).

**3.7. Transfection Efficiency of PF14/pDNA Nanoparticles in Difficult-to-Transfect Cells.** One of the main challenges for different gene delivery vectors is the ability to enable efficient gene transfer also into the difficult-to-transfect cells, for example, primary cells. First, we transfected RD4 skeletal muscle cells, which are known to be more refractory to chemical transfections than regular adherent cells. PF14/pDNA nanoparticles produced more than 1000-fold increase in luciferase expression (Figure 7A). Moreover, similar efficacy levels were maintained in the presence of serum proteins. In line with the results in regular adherent cell lines, particles formed at CR2 seemed to be optimal for transfections as higher ratios did not increase the effect any further. We also compared our results with LF2000, and lipofection in these cells seemed to be more efficient than PF14 (Figure 7A). Next, we sought to investigate if PF14 could mediate gene transfer also in primary cells. For this, we chose to transfect primary mouse embryonal fibroblasts (MEFs), and interestingly, we recorded 1000–10000-fold increase in luciferase activity in serum-free conditions. In the presence of serum, the efficiency was only slightly decreased, still achieving more than 1000-fold increase in luciferase expression as compared to baseline levels (Figure 7B). Finally, another primary cell culture was chosen, namely, mouse embryonic stem (mES) cells, where the potential for genetic manipulations is at high interest for gene therapy applications. PF14/pDNA nanoparticles produced a significant increase in luciferase activity upon transfections, more than 1000-fold, and these effects were well maintained in the presence of serum (Figure 7C). Similarly to the results in RD4 and MEF cells, CR2 produced the most optimal conditions for transfection with PF14, while LF2000 transfected cells with higher efficiency than PF14 in these difficult-to-transfect cells (Figure 7B,C).

#### 4. DISCUSSION

Viral vectors are very efficient for the delivery of genetic material into the cells; however, their efficiency is often coupled to their adverse effects, namely, severe induction of innate immunity and cancerous mutagenesis.<sup>36</sup> Moreover, viral vectors are also not compatible with delivery of short natural or synthetic ONs. Consequently, this has led to the significant interest in the nonviral alternatives. As aforementioned, nonviral vectors are usually based on different synthetic lipids, polymers, or peptides, which condense nucleic acids and their analogues, including pDNA, into nanoparticles, and these particles facilitate intracellular gene delivery, both in vitro and in vivo conditions.<sup>2,3</sup>

CPPs are one group of such nonviral delivery vehicles that comprise suitable delivery properties<sup>4</sup> for different nucleic acids and their analogues. Nanoparticle-forming CPPs have been used in many gene therapy applications, but there are two crucial factors that limit their further use. First, many CPPs cannot condense pDNA into suitably sized stable nanoparticles, and second, even if appropriate particles are formed, they often remain entrapped in endosomal compartments. Nevertheless, as recently shown, the delivery properties of some CPPs can be significantly improved if they are conjugated with certain hydrophobic moieties, for example, stearic acid.<sup>28</sup>

In our previous paper, we demonstrated the delivery potential of PF14 for the cellular transduction of SCOs.<sup>24</sup> It was shown that PF14/SCO nanoparticles were able to induce splice correction in the HeLa pLuc705 cell model but also in the disease relevant in vitro Duchenne's muscular dystrophy (DMD) model.<sup>24</sup> In the current work, we studied whether these delivery properties could be extended to the delivery of pDNA in cell cultures.

First, we characterized the physicochemical properties of PF14/pDNA nanoparticles and showed by various assays that PF14 readily forms nanocomplexes/nanoparticles with pDNA at different CRs. Notably, at CR2, all of the pDNA was condensed into nanoparticles. DLS measurements showed that at CR2 the hydrodynamic diameter of these particles is approximately 135 nm, whereas their size varies from 130 to 170 nm at other CRs (Table 1). We also measured the surface charge of these particles, which was approximately  $-40$  mV at CR2 (Table 1).

It has been suggested that to be biologically active, nanoparticles must be stable enough to reach their targets but still able to dissociate at their sight of action to free their

cargo. We tested peptide/pDNA nanoparticle stability using a heparin displacement assay where heparin is used as a polyanion that can displace plasmids from nanoparticles. Using this assay, we found that PF14 formed more stable nanoparticles than its nonstearylated version. However, at higher concentrations, heparin was still able to displace pDNA from PF14 complexes, indicating that pDNA could be released from the particles by polyanions and be biologically available (Figure 1C,D). We hypothesize that the poor stability renders nsPF14/pDNA complexes biologically inactive, similarly to nonstearylated TP10/pDNA nanoparticles.<sup>22</sup> These data collectively support the hypothesis that hydrophobic interactions play crucial role in the formation and the stability of the CPP/pDNA nanoparticles and consequently their delivery potential.

It is generally recognized that CPPs, especially when associated with cargo, are taken up by different endocytic pathways, which often lead to their endosomal entrapment. This is believed to be the most important factor that limits the efficient delivery and, importantly, the bioavailability of their cargo molecule.<sup>7</sup> By using endosomolytic agents such as chloroquine (CQ), the entrapped material can be at least partially be released, and if CQ treatment increases cargo bioavailability, it can be concluded that endocytosis is involved in the uptake of that material. Thus, using CQ treatment, we confirmed that PF14/pDNA nanoparticles use endocytic pathways to enter cells as it substantially increased the gene expression levels imparted by the PF14/pDNA nanoparticles (Figure 2E). It also suggests that PF14-mediated pDNA delivery could be enhanced by improving endosomal escape capacity of the peptide. Interestingly, while uptake of nsPF14/pDNA nanoparticles appeared virtually nonexistent (Figure 2B,C), CQ treatment still induced a small increase in gene expression. This may indicate that a small fraction of the nonstearylated peptide particles could nevertheless be stable enough to be taken up by the cells.

To have a more precise insight into intracellular trafficking of these nanoparticles, we used TEM. It confirmed the involvement of the endocytic pathways in the uptake, and it indicated that mostly caveolae-mediated endocytosis was used in the process (Figure 3A). The caveolar uptake has been earlier shown to be involved in the cellular delivery of proteins by TP10, the predecessor peptide of PepFect.<sup>37</sup> Furthermore, in concordance with our previous report on SCARA-mediated uptake of PF14/ON nanocomplexes,<sup>26</sup> the knockdown of certain SCARA subtypes significantly decreased the gene expression of the cargo plasmid (Figure 4). This suggests that the latter receptor mediates the uptake of PF14/pDNA nanoparticles in conjunction with caveolae. This is in line with reports that SCARAs are internalized via caveolae-dependent endocytosis in macrophages, where they selectively regulate the apoptosis.<sup>35</sup> In addition, TEM analysis also allowed us to visualize the endosomolytic potential of these nanoparticles, as these PF14/pDNA nanoparticles clearly induced partial disruption of the endosomal membranes in some vesicles (Figure 3D).

PF14/pDNA nanoparticles showed a remarkable gene delivery potential in a variety of adherent cell lines, as they produced around 4 orders of magnitude increase in luciferase expression in CHO, U2OS, U87, and HEK293 cell lines (Figure 5). Importantly, delivery efficiency was not significantly hampered by the presence of serum proteins, which has been an obstacle for most of the CPP-based delivery vehicles and

nonviral vectors in general (Figure 5). We recently reported that the parent peptide of PF14, PF3 peptide, is also an efficient vector for gene delivery.<sup>22</sup> In comparison with PF3, PF14 has substantially improved delivery properties, as it increases luciferase gene expression by at least another order of magnitude (Figure 2D). Moreover, PF14 had higher gene delivery efficiency in the serum-containing media than PF3 in serum-free media (Figure 2D), clearly indicating the superiority of PF14 peptide over PF3 in these settings. Interestingly, PF14/pDNA-mediated gene expression is triggered rapidly, as gene expression was increased after 4 h as compared to baseline levels (Figure 6A). Similarly to the parent PF3 peptide, transfections with PF14 were relatively independent of cell confluence (Figure 6B), and in serum-free conditions, most of the cell population could be transfected (Figure 6C).

Finally, to underline the potential of PF14 as a gene delivery vehicle, we showed that PF14 also enables the gene transfer to primary cells in addition to the above-mentioned adherent cell lines. PF14/pDNA nanoparticles allowed more than 3 orders of magnitude increase in gene expression in RD4 skeletal (Figure 7A) muscle cells but also in primary mouse embryonic fibroblast (MEFs) cells (Figure 7B) and mouse embryonic stem- (mES) cells (Figure 7C). Interestingly, in primary cells, the presence of serum did not affect the gene delivery as much as in regular adherent cell lines. Surprisingly, LF2000 was pronouncedly more efficient in these cells as compared to PF14 than in the regular adherent cell lines.

PF14 is a novel gene delivery vehicle with improved delivery properties and has several advantages over many conventional chemical gene delivery vectors. To our knowledge, PF14 is one of the most efficient CPP-based delivery vector for pDNA in cell culture.<sup>28</sup> An important feature of PF14 is that it transfects a large population of cells, the transfection level is high, and it retains most of its activity in the presence of serum. PF14 has an improved delivery efficiency as compared to its predecessor peptide PF3, and in many cell lines, it reaches and even exceeds the activity of LF2000, an agent known for its high delivery efficiency for pDNA. It is also important that PF14-mediated delivery and its efficiency are not associated with toxic side effects according to the used *in vitro* toxicity and immunogenicity assays, which can be a problem with different lipofection agents, including LF2000.

Considering the future *in vivo* perspective of PF14 for pDNA delivery vehicle, it is also important to point out that a negative surface charge of the PF14/pDNA nanoparticles (Table 1) might offer several advantages over other nanoparticle-based systems that have a positive surface charge, as it has been shown that negatively charged particles stay longer in the systemic circulation.<sup>38</sup> This could be due to the facts that negatively charged particles are less prone to interact with mainly negatively charged components of the serum, such as albumins; they have smaller tendency to interact with the anionic components on the cell surface; and it seems that specific receptors could be responsible for their uptake, meaning they could have tendency to accumulate in certain tissues. Experiments in our lab are ongoing along these lines, and it remains to be established if this vector could also be utilized for the nucleic acid delivery *in vivo*. Conclusively, PF14 is an efficient delivery agent for the delivery of pDNA in cell cultures.



## ■ ASSOCIATED CONTENT

## ■ Supporting Information

Figures of the stability of PF14/pDNA nanoparticles in the presence of SCARA inhibitors (Figure S1) and transfection efficiency of PF14/pDNA nanoparticles in cell populations: impact of the presence of serum (Figure S2). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

## Corresponding Author

\*Address: Laboratory of Molecular Biotechnology, Institute of Technology, University of Tartu, Nooruse 1, 50411 Tartu, Estonia. Tel: +372-7-37-4866. Fax: +372-7-37-4900. E-mail: [lehto@ut.ee](mailto:lehto@ut.ee) or [taavi.lehto@gmail.com](mailto:taavi.lehto@gmail.com).

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The work presented in this article was supported by Swedish Research Council (VR-NT); by Center for Biomembrane Research, Stockholm; by Cancer Foundation, Sweden, by Knut and Alice Wallenberg's Foundation; by the EU through the European Regional Development Fund through the Center of Excellence in Chemical Biology, Estonia; by the targeted financing SF0180027s08 and 0180019s11 from the Estonian Government; and by the Estonian Science Foundation (ETF 8705).

## ■ ABBREVIATIONS

CPP, cell-penetrating peptide; CR, charge ratio; DLS, dynamic light scattering; DMD, Duchenne's muscular dystrophy; EGFP, enhanced green fluorescent protein; LF2000, Lipofectamine 2000; LPS, lipopolysaccharide; ON, oligonucleotide; FACS, fluorescence activated cell sorter; pDNA, plasmid DNA; PF3, PepFect3; PF14, PepFect14; RFU, relative fluorescence unit; RLU, relative light unit; SCARA, scavenger receptor class A; SCO, splice-correcting oligonucleotide; TFA, trifluoroacetic acid; TP10, transportan 10; nsPF14, nonstearylated PepFect14

## ■ REFERENCES

- (1) Mulligan, R. C. The basic science of gene therapy. *Science* **1993**, *260* (5110), 926–932.
- (2) Glover, D. J.; Lipps, H. J.; Jans, D. A. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6* (4), 299–310.
- (3) Pack, D. W.; Hoffman, A. S.; Pun, S.; Stayton, P. S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4* (7), 581–593.
- (4) Lindgren, M.; Langel, Ü. Classes and prediction of cell-penetrating peptides. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *683*, 3–19.
- (5) Mäe, M.; EL Andaloussi, S.; Lehto, T.; Langel, Ü. Chemically modified cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids. *Expert Opin. Drug Delivery* **2009**, *6* (11), 1195–1205.
- (6) Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61* (11), 953–964.
- (7) Hassane, F. S.; Saleh, A. F.; Abes, R.; Gait, M. J.; Lebleu, B. Cell penetrating peptides: Overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67* (5), 715–726.
- (8) Järver, P.; Mäger, I.; Langel, Ü. In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31* (11), 528–535.
- (9) Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157* (2), 195–206.
- (10) Lundin, P.; Johansson, H.; Guterstam, P.; Holm, T.; Hansen, M.; Langel, Ü.; EL Andaloussi, S. Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2535–2542.
- (11) Futaki, S.; Nakase, I.; Tadokoro, A.; Takeuchi, T.; Jones, A. T. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35* (4), 784–787.
- (12) Morris, M. C.; Chaloin, L.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (17), 3510–3517.
- (13) Rittner, K.; Benavente, A.; Bompard-Sorlet, A.; Heitz, F.; Divita, G.; Brasseur, R.; Jacobs, E. New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* **2002**, *5* (2), 104–114.
- (14) Ignatovich, I. A.; Dizhe, E. B.; Pavlotskaya, A. V.; Akiyev, B. N.; Burov, S. V.; Orlov, S. V.; Perevozchikov, A. P. Complexes of plasmid DNA with basic domain 47–57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (43), 42625–42636.
- (15) Liu, Z.; Li, M.; Cui, D.; Fei, J. Macro-branched cell-penetrating peptide design for gene delivery. *J. Controlled Release* **2005**, *102* (3), 699–710.
- (16) Johnson, L. N.; Cashman, S. M.; Kumar-Singh, R. Cell-penetrating peptide for enhanced delivery of nucleic acids and drugs to ocular tissues including retina and cornea. *Mol. Ther.* **2008**, *16* (1), 107–114.
- (17) Trabulo, S.; Mano, M.; Faneca, H.; Cardoso, A. L.; Duarte, S.; Henriques, A.; Paiva, A.; Gomes, P.; Simoes, S.; de Lima, M. C. S4(13)-PV cell penetrating peptide and cationic liposomes act synergistically to mediate intracellular delivery of plasmid DNA. *J. Gene Med.* **2008**, *10* (11), 1210–1222.
- (18) Midoux, P.; Kichler, A.; Boutin, V.; Maurizot, J. C.; Monsigny, M. Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9* (2), 260–267.
- (19) Oskolkov, N.; Arukuusk, P.; Copolovici, D. M.; Lindberg, S.; Margus, H.; Padari, K.; Pooga, M.; Langel, Ü. NickFects, Phosphorylated Derivatives of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2011**, *17* (2), 147–157.
- (20) Lehto, T.; Abes, R.; Oskolkov, N.; Suhorutshenko, J.; Copolovici, D.; Mäger, I.; Viola, J.; Simonson, O.; Ezzat, K.; Guterstam, P.; Eriste, E.; Smith, C.; Lebleu, B.; EL Andaloussi, S.; Langel, Ü. Delivery of nucleic acids with a stearylated (R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>)<sub>4</sub> peptide using a non-covalent co-incubation strategy. *J. Controlled Release* **2010**, *141* (1), 42–51.
- (21) Futaki, S.; Ohashi, W.; Suzuki, T.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Harashina, H.; Sugiura, Y. Stearylated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12* (6), 1005–1011.
- (22) Lehto, T.; Simonson, O. E.; Mäger, I.; Ezzat, K.; Sork, H.; Copolovici, D.-M.; Viola, J. R.; Zaghoul, E. M.; Lundin, P.; Moreno, P. M. D.; Mäe, M.; Oskolkov, N.; Suhorutshenko, J.; Smith, C. I. E.; EL Andaloussi, S. A Peptide-based Vector for Efficient Gene Transfer In Vitro and In Vivo. *Mol. Ther.* **2011**, *19* (8), 1457–1467.
- (23) Mäe, M.; EL Andaloussi, S.; Lundin, P.; Oskolkov, N.; Johansson, H. J.; Guterstam, P.; Langel, Ü. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J. Controlled Release* **2009**, *134* (3), 221–227.
- (24) Ezzat, K.; EL Andaloussi, S.; Zaghoul, E. M.; Lehto, T.; Lindberg, S.; Moreno, P. M. D.; Viola, J. R.; Magdy, T.; Abdo, R.; Guterstam, P.; Sillard, R.; Hammond, S. M.; Wood, M. J. A.; Arzumanov, A. A.; Gait, M. J.; Smith, C. I. E.; Hallbrink, M.; Langel, Ü. PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (12), 5284–5298.
- (25) EL Andaloussi, S.; Lehto, T.; Mäger, I.; Rosenthal-Aizman, K.; Oprea, I. I.; Simonson, O. E.; Sork, H.; Ezzat, K.; Copolovici, D. M.; Kurnikoff, K.; Viola, J. R.; Zaghoul, E. M.; Sillard, R.; Johansson, H. J.

- Said Hassane, F.; Guterstam, P.; Suhorutšenko, J.; Moreno, P. M.; Oskolkov, N.; Hålldin, J.; Tedebark, U.; Metspalu, A.; Lebleu, B.; Lehtio, J.; Smith, C. I. E.; Langel, Ü. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (9), 3972–3987.
- (26) Ezzat, K.; Helmfors, H.; Tudoran, O.; Juks, C.; Lindberg, S.; Padari, K.; EL Andaloussi, S.; Pooga, M.; Langel, Ü. Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *FASEB J.* **2012**, *26* (3), 1172–1180.
- (27) Padari, K.; Koppel, K.; Lorents, A.; Hällbrink, M.; Mano, M.; Pedroso de Lima, M. C.; Pooga, M. S4(13)-PV cell-penetrating peptide forms nanoparticle-like structures to gain entry into cells. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (4), 774–783.
- (28) Lehto, T.; Ezzat, K.; Langel, Ü. Peptide nanoparticles for oligonucleotide delivery. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, *104*, 397–426.
- (29) Deshayes, S.; Morris, M.; Heitz, F.; Divita, G. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60* (4–5), 537–547.
- (30) Nakase, I.; Akita, H.; Kogure, K.; Graslund, A.; Langel, U.; Harashima, H.; Futaki, S. Efficient Intracellular Delivery of Nucleic Acid Pharmaceuticals Using Cell-Penetrating Peptides. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *45* (7), 1132–1139.
- (31) Crombez, L.; Morris, M. C.; Deshayes, S.; Heitz, F.; Divita, G. Peptide-Based Nanoparticle for Ex Vivo and In Vivo Drug Delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14* (34), 3656–3665.
- (32) Richter, T.; Floetenmeyer, M.; Ferguson, C.; Galea, J.; Goh, J.; Lindsay, M. R.; Morgan, G. P.; Marsh, B. J.; Parton, R. G. High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic* **2008**, *9* (6), 893–909.
- (33) Platt, N.; Gordon, S. Scavenger receptors: Diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chem. Biol.* **1998**, *5* (8), 193–203.
- (34) Peiser, L.; Gordon, S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect.* **2001**, *3* (2), 149–159.
- (35) Zhu, X. D.; Zhuang, Y.; Ben, J. J.; Qian, L. L.; Huang, H. P.; Bai, H.; Sha, J. H.; He, Z. G.; Chen, Q. Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (10), 8231–8239.
- (36) Thomas, C. E.; Ehrhardt, A.; Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4* (5), 346–358.
- (37) Säälilik, P.; Padari, K.; Niinep, A.; Lorents, A.; Hansen, M.; Jokitalo, E.; Langel, Ü.; Pooga, M. Protein delivery with transportans is mediated by caveolae rather than flotillin-dependent pathways. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (5), 877–887.
- (38) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (4), 505–515.

# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Kadi-Liis Veiman  
(*autori nimi*)  
(sünnikuupäev: 12.09 1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Rakku sisenev peptiid, PepFect14, efektiivseks geeni transpordiks *in vitro* ja *in vivo*,  
tingimustes,  
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja(d) on Ülo Langel ja Taavi Lehto  
(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05 2013 (*kuupäev*)